FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 2

DÉTECTION DES SELS D'AMMONIUMS QUATERNAIRES DANS LES LAITS

QUELQUES ASPECTS DE L'INTOXICATION CHEZ L'ANIMAL

Travail du Laboratoire de Microbiologie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie

●

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille le 2 Juillet 1956

par

CLAUDE GASTIN
Né le 24 Janvier 1930 en Avignon (Vaucluse)
PHARMACIEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

	MM. PÉLLISSIER	Président
Examinateurs de la Thèse	BALANSARD	
	GREBUS	Assesseurs
	BERNARD	

MAISON AUBANEL PÈRE - AVIGNON

DÉTECTION DES SELS D'AMMONIUMS QUATERNAIRES DANS LES LAITS

QUELQUES ASPECTS DE L'INTOXICATION CHEZ L'ANIMAL

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 2

DÉTECTION DES SELS D'AMMONIUMS QUATERNAIRES DANS LES LAITS

QUELQUES ASPECTS DE L'INTOXICATION CHEZ L'ANIMAL

Travail du Laboratoire de Microbiologie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie

●

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille le 2 Juillet 1956

par

CLAUDE GASTIN

Né le 24 Janvier 1930 en Avignon (Vaucluse)

PHARMACIEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse	MM. PÉLLISSIER	Président
	BALANSARD	Assesseurs
	GREBUS	
	BERNARD	

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

MAISON AUBANEL PÈRE - AVIGNON

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen : G. MORIN. *Assesseur :* J. DELPHAUT.

Doyen Honoraire : L. IMBERT.

Professeurs Honoraires MM. AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, HECKENROTH, JOYEUX, MONGES, OLMER, RIMATTEI, ROCHE, ROGER.

Secrétaire : J. COMTE. *Bibliothécaire :* Mlle PERRIN.

Professeurs

Anatomie	GRISOLI.
Anatomie Pathologique	GASTAUT.
Bactériologie et Pathologie Générale	BRAHIC.
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER.
Cardiologie Clinique et Expérimentale	JOUVE.
Chimie Médicale	DERRIEN.
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX.
Chimie	DUMAZERT.
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE.
Clinique Chirurgicale	MOIROUD.
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique	SALMON.
Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie Expérimentale	DE VERNEJOUL.
Clinique Dermato-syphiligraphique	CHARPY.
Clinique Exotique	BLANC.
Clinique des Maladies du Système Nerveux	POURSINES.
Clinique Médicale	MATTEI.
Clinique Médicale	POINSO.
Clinique Médicale Thérapeutique	J. OLMER.
Clinique des Maladies des Voies Digestives et de la Nutrition	RECORDIER.
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD.
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS.
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON.
Clinique Ophtalmologique	JAYLE.
Clinique Urologique	CHAUVIN.
Histologie	PICARD.
Hygiène et Médecine Préventive	SAUTET.
Matière Médicale	BALANSARD.
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER.
Parasitologie	RANQUE.
Pathologie Chirurgicale	N...
Pathologie Interne	AUDIER.

Pharmacologie . . . . . F MERCIER.
Pharmacie Chimique et Toxicologie. . . . . VIGNOLI.
Pharmacie Galénique. . . . . DELPHAUT.
Physiologie . . . . . MORIN.
Physique Médicale . . . . . DUBOULOZ.
Thérapeutique . . . . . PIERI.
Professeur sans chaire . . . . . ROUX.

Maîtres de Conférences-Agrégés

MM. BERNARD Pierre.
BOURRET.
DEPIEDS.
DESANTI.
DONNET.
GAMBARELLI.
GREBUS.
LISSITSKY.
MOURGUE.
PASTOR.
PAYAN.
TAMALET.

Agrégés en exercice

MM. APPAIX.
BERNARD René.
CHARPIN.
CHAUVIN.
CREMIEUX.
DEVIN.
GRANJON.
LAVAL
MARONNEAUD.
METRAS
MONGES Henri.
MOUREN.
OLLIVIER.
ORSINI.
OURGAUD.
PAOLI.
RAYBAUD.
SERMENT.

Agrégés libres

MM. BERTHIER.
FIGARELLA.
HENRY.
IMBERT.
LAMY.
LENA.
VAGUE.

Chargé des Fonctions de Maîtres de Conférence

Histologie. . . . . M. STAHL.

A MES PARENTS

A MES AMIS.

A notre Président de Thèse,

Monsieur le Professeur F. PELLISSIER,

qui a eu l'obligeance de nous proposer le sujet de cette thèse, et nous a fait l'honneur d'en présider la soutenance.
Nous le prions de bien vouloir trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre vive gratitude.

A Monsieur le Professeur J. BALANSARD.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre reconnaissance pour l'enseignement qu'il nous a prodigué au cours de nos études et l'accueil bienveillant qu'il nous a toujours réservé.

A Monsieur le Professeur Agrégé C. GREBUS,

qui nous a reçu avec tant de complaisance dans son laboratoire et n'a cessé de nous diriger avec un dévouement quotidien dans l'élaboration de notre thèse.

Au terme de ce travail, nous ne pouvons que le remercier bien vivement des conseils précieux qu'il n'a cessé de nous prodiguer et qui ont si grandement facilité notre tâche.

A Monsieur le Professeur Agrégé P. BERNARD,

qui s'est aimablement intéressé à notre travail. Nous le prions de recevoir l'expression de notre respectueuse sympathie.

A MES MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

A TOUS MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE BOTANIQUE ET DE MICROBIOLOGIE

et en particulier

à Monsieur M. QUILICHINI
DOCTEUR EN PHARMACIE

en remerciement des conseils et de l'aide qu'il nous a constamment prodigués.

INTRODUCTION

Dans un rapport présenté au Conseil Permanent d'Hygiène Sociale, le Professeur TRUHAUT se préoccupait récemment des dangers qui résultent de l'adjonction de substances étrangères aux aliments, et notamment des risques de cancérisation.

Si l'on admet que la présence dans les produits de consommation courante de substances exogènes de nature chimique peut conduire à l'extension d'affections cancéreuses ou autres, il apparaît comme indispensable de prendre des mesures de prophylaxie convenables.

Il y a longtemps déjà, le Conseil Supérieur d'Hygiène et l'Académie de Médecine à la suite d'études toxicologiques et pharmacologiques avaient interdit (décret du 15 Avril 1912, arrêté du 28 Juin 1912) l'emploi des antiseptiques comme conservateurs des denrées alimentaires.

Les exigences de la vie moderne, le développement de l'industrie des conserves alimentaires, particulièrement dans certains pays, et aussi la diffusion de ces denrées à travers le globe, ont conduit à l'utilisation de substances chimiques incorporées à l'aliment, destinées à sa conservation.

D'autre part, l'utilisation en agriculture d'engrais chimiques, de substances favorisant la croissance ou destinées à la lutte contre les infections microbiennes ou parasitaires des végétaux est venue apporter dans notre alimentation des substances plus ou moins nocives.

Il en est de même de l'alimentation artificielle du bétail ou des thérapeutiques destinées soit à augmenter le rendement en poids de viande, soit à traiter ou prévenir diverses affections.

Parmi ces produits notre attention s'est portée sur les SELS D'AMMONIUMS QUATERNAIRES.

La législation française autorise depuis le 1er juin 1951 l'usage exclusif de ces composés pour le nettoyage des appareils et récipients utilisés dans les industries alimentaires, à condition qu'il soit suivi d'un rinçage rigoureux à l'eau potable. En cas de rinçage insuffisant ces agents peuvent s'incorporer aux denrées alimentaires, au lait par exemple. Des recherches faites dans l'état de New-

York ont montré que l'on retrouvait des composés d'ammoniums quaternaires dans plus de 4 °/° des laits examinés (KOSIKOWSKY) (37).

Que faut-il penser de ces produits ? Sont-ils vraiment toxiques, ou bien l'organisme humain peut-il supporter sans danger l'administration répétée de faibles doses dans les produits de consommation courante ? Certains chimistes étrangers l'admettent et préconisent leur emploi comme conservateurs alimentaires. Dans un article détaillé sur les ammoniums antiseptiques, J. RENAULT (52) se demande même si l'on ne doit pas pour ces composés modifier la législation en vigueur.

Nos connaissances actuelles sur la nocivité des substances étrangères pouvant être incorporées aux aliments se limitent le plus souvent aux effets de toxicité aiguë. Elles sont malheureusement très rudimentaires sur l'action beaucoup plus importante de la toxicité chronique. La plus grande prudence doit donc être observée dans un emploi trop généralisé de ces agents conservateurs.

Rappelons sommairement quelles sont à l'heure actuelle les diverses utilisations des composés d'ammoniums quaternaires en tant qu'antiseptiques.

— En *médecine*, ils se révèlent efficaces dans le traitement des affections externes, des plaies, des brûlures, des pyodermites, ainsi que dans le traitement des infections genito-urinaires. Leur emploi s'étend aussi à la prophylaxie de la bouche, de la gorge et du nez. Ils sont très employés dans les hôpitaux pour la stérilisation du matériel de chirurgie, pour la désinfection des mains du chirurgien, et pour l'aseptie du champ opératoire.

— Dans les *industries alimentaires*, ils servent surtout au nettoyage des récipients destinés à être mis en contact avec les denrées alimentaires. C'est ainsi que l'industrie laitière, les brasseries, les cidreries, les sucreries et l'industrie vinicole en font une grande consommation.

— En *agriculture*, ils sont de plus en plus appréciés pour la désinfection des animaux et des locaux et constituent un moyen de prévention très sûr en cas d'épidémie.

Objet du travail

Il nous a paru intéressant d'étudier expérimentalement l'influence des sels d'ammoniums quaternaires administrés à doses relativement faibles mais prolongées chez l'animal (cobaye et lapin) :

a/ — sur les modifications cytologiques sanguines ;

b/ — sur la flore intestinale.

En outre, en cas de mort ou de sacrifice, nous nous proposons d'autopsier les animaux pour déceler des modifications possibles macroscopiquement visibles.

D'autre part, intéressé au Laboratoire de Microbiologie du Professeur GREBUS par le contrôle bactériologique du lait pour le Service de Répression des Fraudes, et disposant de nombreux échantillons de lait pasteurisé provenant des ateliers du département, nous avons pensé rechercher sur un certain nombre d'entre eux les sels d'ammoniums quaternaires pouvant y être introduits intentionnellement ou accidentellement, puisque l'emploi de ces antiseptiques est autorisé pour la désinfection des récipients et du matériel laitier.

Plan général

Il était important avant de commencer nos recherches personnelles de faire le point dans une *première partie* des connaissances déjà acquises sur les sels d'ammoniums quaternaires antiseptiques.

Définition, nomenclature, classification des différents agents tensio-actifs connus à l'heure actuelle, serviront de préliminaires à cette étude générale.

Nous passerons ensuite en revue en les définissant les diverses actions des ammoniums quaternaires.

Notre examen se poursuivra par l'étude de la toxicité de ces composés sous ses deux aspects :

— toxicité aiguë
— toxicité chronique.

Et nous terminerons ce tour d'horizon par une mise au point des *différentes méthodes* employées pour la *recherche* et le *dosage* des sels d'ammoniums quaternaires.

Notre travail personnel comprendra deux parties :

1°/ — *la recherche et le dosage des sels d'ammoniums quaternaires* dans les laits pasteurisés de la région provençale

a/ — par la méthode chimique d'AUERBACH (3) (4)
b/ — par la méthode biologique de PIEN, LIGNAC et CLAUDE (49).

2°/ — *l'étude de la toxicité chronique sur les animaux, comprenant :*

— un examen des modifications cytologiques sanguines;
— une recherche détaillée des modifications possibles de la flore intestinale des animaux à la suite de l'absorption régulière de sels d'ammoniums quaternaires.

Un dernier chapitre enfin nous permettra d'exposer nos *conclusions générales.*

GÉNÉRALITÉS

Les ammoniums quaternaires sont loin d'être une nouveauté chimique. On connaît depuis longtemps déjà l'action thérapeutique d'un certain nombre de leurs dérivés ; parmi ceux-ci notons l'importance des sels de choline dont les propriétés pharmacodynamiques sont remarquables par leur ampleur et leur diversité.

Par contre, l'utilisation de certains d'entre eux en tant qu'antiseptiques ne date que de quelques dizaines d'années. Le mérite de cette découverte revient à JACOBS (30) qui en 1915 prépara et étudia de nombreux dérivés de l'hexaméthylène-tetramine. L'étude de ces composés fut reprise en 1935 par DOMAGK (16) qui montra le grand pouvoir antiseptique de nombreux ammoniums quaternaires (tels certains diméthyl-alcoyl-benzyl-ammoniums).

En 1938, il faut citer les travaux de HARTLEY (29) sur le dosage chimique et ceux de DUNN (19) sur le pouvoir antiseptique. En 1942, ceux de BECHER (7) et ceux de FLOTOW (23) sur la toxicité.

Dès lors on assiste à l'éclosion dans le monde entier d'un nombre important de travaux sur les sels d'ammoniums quaternaires.

En 1943, AUERBACH (3) met au point la technique de dosage chimique dont le principe repose sur la formation d'un sel complexe entre un colorant sulfonique halogène et le sel quaternaire. Cette méthode fut remaniée et améliorée successivement par WILSON (63) en 1946, par COLICHMAN (11) en 1947, par PIEN (48) en 1951, et par GOTTLIEB (25) en 1953.

Aux Etats-Unis la mesure de l'activité antiseptique de ces corps est menée de front en 1946 par SHELTON (56) et ses collaborateurs, par QUISNO et FOTER (51), par DUBOIS et DIBBLEE (17), par KLARMANN et WRIGHT (32 à 35).

Ces auteurs définissent le pouvoir antimicrobien de nombreux dérivés vis-à-vis de toute une série de germes.

En 1947, MAC CULLOCH (42) évalue l'activité bactéricide et fongicide. En 1950, GURRANN et EVANS (28) effectuent des recherches sur l'activité bactériostatique, SMITH (58) et l'Ecole de Los Angelès recherchent l'effet bactéricide des agents tensio-actifs sur le bacille tuberculeux.

L'étude de la toxicité aiguë est entreprise en 1949 par SCHWARTZ (55), complétée par STEWART (60) en 1950, puis par KEITH (31) et par ADELSON (1) en 1952.

Le problème de la toxicité chronique est posé par FITZHUGH et NELSON (22) en 1948 et par FINNEGAN (21) en 1953 sans que les résultats obtenus apportent une solution satisfaisante.

A l'heure actuelle les agents tensio-actifs fournissent chaque année la matière de nombreux ouvrages.

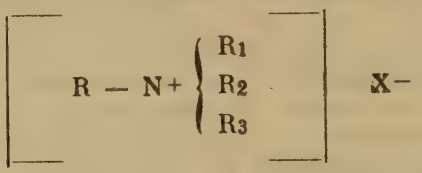
Parmi les plus détaillés il faut citer l'article de J. RENAULT (52) paru en 1954, qui fait le point des connaissances les plus récentes sur les sels d'ammoniums quaternaires.

Définition

Les sels d'ammoniums quaternaires antiseptiques sont rangés dans le groupe des *détergents de synthèse,* eux-mêmes divisés en :

1°/ — détergents anioniques =
- — alcools gras sulfonés
- — amides grasses
- — alkyl-sulfates
- — aryl-alkyl-sulfates;

2°/ — détergents cationiques
essentiellement constitués par les sels d'ammoniums quaternaires, leur formule générale est la suivante :



R = longue chaîne hydrocarbonée de 8 à 18 atomes de carbone
R_1, R_2, R_3 = groupements organiques à faible poids moléculaire (méthyl, éthyl, benzyl, etc...)
X = anion tel que Cl, Br ou SO_4CH_3 etc...

L'azote peut également faire partie d'un hétérocycle (dérivés du pyridinium, du quinolinium).

Mode de Préparation

La préparation des sels d'ammoniums quaternaires se fait pratiquement par le procédé HOFFMANN. Il consiste à faire réagir un halogénure d'alcoyle sur une base tertiaire, en général au sein d'un solvant anhydre.

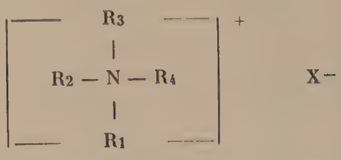
Principaux Ammoniums Quaternaires

On peut en distinguer trois grandes classes :
- — les dérivés des trialcoylamines
- — les dérivés des dialcoylbenzylamines
- — les dérivés d'hétérocycles azotés.

Tableau des principaux ammoniums quaternaires antiseptiques

d'après J. RENAULT (51)

DÉRIVÉS DES TRIALCOYLAMINES

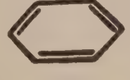


Dénomination	R_1	R_2	R_3	R_4	X	Dénomination chimique
Cetavlon-Cetab, Cirrodol OD.	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	$-(CH_2)_{15}-CH_3$	Br–	Bromure de triméthyl-cetyl-ammonium.
Retarder LA	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	$-(CH_2)_{17}-CH_3$	Br–	Bromure de triméthyl-stearyl-ammonium.
Ethyl-cetab.	$-CH_3$	$-C_2H_5$	$-CH_3$	$-(CH_2)_{15}-CH_3$	Br–	Bromure de diméthyl-éthyl-cetyl-ammon.
Diomethan	$-CH_3$	$-(CH_2)_7CH_3$	$-CH_3$	$-(CH_2)_7-CH_3$	Br–	Bromure de diméthyl-di-n-octyl-ammon.
Deciquam	$-CH_3$	$-(CH_2)_9CH_3$	$-CH_3$	$-(CH_2)_9-CH_3$	Br–	Bromure de diméthyl-di-n-decyl-ammon.
Onyxide, Amerse, Quartol	$-CH_3$	$-C_2H_5$	$-CH_3$	$-(CH_2)_8-CH=CH(CH_2)_7CH_3$	Cl–	Chlorure de diméthyl-éthyl-oleyl-ammon.

DÉRIVÉS DES DIALCOYLBENZYLAMINES

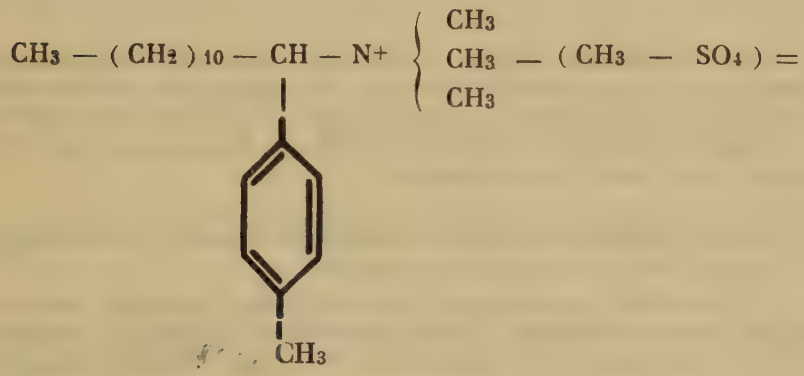
Dénomination	R_1	R_2	R_3	R_4	X	Dénomination chimique
Thoral, Nopco	$-CH_3$	$-C_6H_5CH_2$	$-CH_3$	$(CH_2)_{11}-CH_3$	Cl–	Chlorure de diméthyl-dodecyl-benzyl-amm.
Triton K. 12	$-CH_3$	$-C_6H_5CH_2$	$-CH_3$	$(CH_2)_{15}-CH_3$	Cl–	Chlorure de diméthyl-cetyl-benzyl-ammon.
Triton K. 60	$-CH_3$	$-C_6H_5-CH_2$	$-CH_3$	$(CH_2)_{17}-CH_3$	Cl–	Chlorure de diméthyl-stéaryl-benzyl-amm.
Roccal, Zephiran, Zephirol, Cequartyl "A"	$-CH_3$	$-C_6H_5-CH_2$	$-CH_3$	homologues pairs des carbures saturés de C8 à C18	Cl–	Chlorures de diméthyl-alcoyl-benzyl-amm.
Tetrosan	$-CH_3$	$-C_6H_3-Cl_2-CH_2$	$-CH_3$	– » –	Cl–	Chlorures de diméthyl-alcoyl-di-chloro-3-4-benzyl-ammonium.
Phémérol, Hyamine 1622	$-CH_3$	$-C_6H_5-CH_2$	$-CH_3$	$(CH_2-CH_2-O)_2-C_6H_4-C(CH_3)_2-CH_2-C(CH_3)_3$	Cl–	Chlorure de diméthyl (p-diisobutyl-phenoxy-ethoxy-éthyl)-benzyl-ammonium.

DÉRIVÉS D'HÉTÉROCYCLES AZOTES

Isothan Q 4	$N^+ - (CH_2)_{11} - CH_3$	Br–	Bromure de lauryl-pyridinium.
Ceepryn, Fixanol C.	$N^+ - (CH_2)_{15} - CH_3$	Br–	Bromure de cetyl-pyridinium.
Emulsept.	 $N^+ - CH_2 - CO - NH(CH_2)_2 - O - C(=O) - (CH_2)_n - CH_3$	Cl–	Chlorures de N-(acyl-colamino - formyl - méthyl-pyridiniums.
Isothan Q 15	$N^+ - (CH_2)_{11} - CH_3$	Br–	Bromure de lauryl-iso-quinolinium.

Dans nos expérimentations nous avons utilisé le métho-sulfate de méthyl-phényl-dodécyl-triméthyl-ammonium spécialisé sous la dénomination de « DESOGENE » (*).

Formule chimique du Désogène :



Propriétés physiques

Ces corps sont très solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants organiques, non entraînables par la vapeur d'eau.

Certains possèdent le pouvoir d'abaisser la tension superficielle. Appelés pour cela *surface active agents* par les Anglo-Saxons, ils sont souvent désignés en France sous le nom d'*agents tensio-actifs*.

Il est à noter que cette propriété n'est pas liée, comme on pourrait le croire, au pouvoir antiseptique de ces composés. En effet, parmi les ammoniums quaternaires fortement tensio-actifs, un certain nombre seulement sont vraiment antiseptiques. D'autre part, les concentrations pour lesquelles se manifestent leur effet antimicrobien sont si faibles que leur activité de surface est alors négligeable (LECHAT) (41).

Nous remarquerons que les ammoniums quaternaires précipitent les protéines. Cette propriété a pour effet de diminuer considérablement leur pouvoir antiseptique dans les milieux riches en protéines tels le sérum et le lait, milieux qui exigent des concentrations beaucoup plus fortes en ces agents pour être conservés (RENAULT) (52).

(*) Etablissements GEIGY.

Généralités sur les antiseptiques

Avant d'aborder l'étude particulière des sels d'ammoniums quaternaires, il nous paraît intéressant de rappeler les notions classiques sur les antiseptiques en général et la mesure de leur activité.

D'après SARTORY et MEYER (54) un bon antiseptique doit répondre aux conditions suivantes :

« 1/ — posséder un *pouvoir bactéricide* prononcé vis-à-vis du plus grand nombre de bactéries possible.

2/ — offrir le *minimum d'action chimique* en ce qui concerne les *différents substrats* de l'agent infectieux, afin que ces supports ne protègent l'agent parasitaire que par leurs modifications chimiques.

3/ — offrir *le minimum d'action nocive vis-à-vis des différents objets* à désinfecter et à stériliser.

4/ — *être facilement soluble* dans les solvants usuels et en particulier l'eau; de plus les solutions doivent rester stables.

5/ — n'offrir qu'*un minimum de toxicité* vis-à-vis de l'homme et des animaux domestiques.

6/ — ne pas risquer d'*incommoder par son odeur désagréable* ou ses émanations dangereuses. »

Plusieurs méthodes se proposent de contrôler la résistance des germes vis-à-vis des antiseptiques en solution.

Par exemple la méthode classique de RIDEAL - WALKER qui détermine le *coefficient phénol.*

Cette méthode mesure la puissance d'un désinfectant par comparaison à l'*acide phénique,* choisi comme témoin.

Technique

Préparer une solution aqueuse de phénol au 1/10^{e} ; au moyen de celle-ci, on réalise des solutions croissantes : 1/50^{e}, 1/75^{e}, 1/100^{e}, 1/125^{e}, 1/150^{e}, 1/200^{e}. D'autre part, effectuer des cultures de

bouillon de *Bacille coli* et de *Staphylocoque*. Elles seront utilisables 24 h. plus tard. A ce moment porter dans les dilutions phéniquées une émulsion bactérienne de chacune des espèces.

Effectuer successivement des prélèvements sensiblement identiques au point de vue quantitatif, au bout de 2 minutes 1/2, 5, 7 1/2, 10, 12 1/2 et 15 minutes. Les ensemencer sur gélose liquéfiée à 40° que l'on coule en boîtes. Déterminer le lendemain la dilution et le temps d'action qui inhibent la croissance de ces deux bactéries.

Interprétation

Le *phénol standard* doit détruire en 15 minutes le *Staphylocoque* à la dilution au 1/100e et le *Bacille coli* en 15 minutes à la dilution au 1/125e.

En se basant sur ces faits marquant le pouvoir antiseptique du phénol, on répète ces expériences pour contrôler les autres antiseptiques, en remplaçant les solutions d'*acide phénique* par des dilutions en rapport avec le pouvoir microbicide de l'antiseptique à examiner.

En dehors de cette méthode on peut citer deux techniques utilisées pour l'étude de l'action des antiseptiques sur les germes microbiens.

D'une part la méthode de BECHHOLD - EHRLICH, que l'on emploie pour mesurer la *dose destructive* d'un *antiseptique* vis-à-vis d'un microorganisme, c'est-à-dire, la *quantité d'antiseptique minimum nécessaire pour le tuer dans un temps donné.*

D'autre part, la technique de GUEGUEN qui est destinée à fixer la *dose infertilisante d'un antiseptique* vis-à-vis d'un microorganisme ; elle a pour objet la *détermination de la concentration antiseptique qui est nécessaire pour en inhiber la croissance.*

Pouvoir antiseptique des Sels d'Ammoniums Quaternaires

L'activité antimicrobienne de certains sels d'ammoniums quaternaires fut révélée par JACOBS (30) en 1915.

L'étude en fut reprise par DOMAGK (16) en 1935 qui montra le grand pouvoir antiseptique de certains diméthyl-alcoyl-benzyl-ammoniums.

A l'heure actuelle les travaux entrepris par les auteurs Anglo-Saxons (MAC CULLOCH (42), LAWRENCE (40), SMITH et collaborateurs (58), Italiens (BEGNINO et BERTI (8) et Français (DAMIENS (15), donnent une idée exacte des différents aspects de l'action antiseptique de ces composés.

Mode d'action sur les bactéries

Les savons cationiques ont la propriété de dissocier des liaisons labiles qui existent entre co-enzyme et protéine dans certains enzymes.

On a pu constater que l'influence des agents cationiques sur la paroi cellulaire des microorganismes se traduit par une lésion accompagnée de libération d'acide glutamique et de lysine.

L'action antimicrobienne pourrait s'expliquer par le blocage des positions réactives des enzymes cellulaires vitaux (BALATRE) (6).

Influences extérieures

Des facteurs extrinsèques peuvent modifier le pouvoir antimicrobien des agents tensio-actifs.

Ainsi BUTTERFIELD (9) note qu'une élévation de température favorise leur action et que la nature de l'eau entrant dans les dilutions est susceptible d'intervenir.

Les sels d'ammoniums quaternaires sont stables dans une grande limite de pH (3 à 10), mais une forte acidité diminue considérablement leur pouvoir antiseptique (STUART (61), SOIKE et coll. (59).

Certains corps possèdent une action antagoniste vis-à-vis de ces composés. Parmi ceux-ci il faut noter les savons (BUTTERFIELD) (9), la lécithine (BEGNINO et BERTI) (8), l'histidine (SIJPEBTEIJN) (57) et le rouge congo (COLLINS) (12).

Par contre le chlorure de cobalt a révélé une action potentialisatrice, ainsi que l'ont montré les travaux de GERSHENFELD et STEDMANN (24) sur le bromure d'alkyl-triméthyl-ammonium.

Pour en simplifier l'exposé nous avons divisé notre étude en cinq parties selon le plan suivant :

— activité bactéricide
— activité bactériostatique
— activité fongicide
— activité fongostatique
— activité sporicide.

ACTIVITÉ BACTÉRICIDE

Rappelons qu'*on appelle bactéricide toute substance susceptible de causer la mort des bactéries.*

Notions générales.

Tous les germes ne sont pas également sensibles aux sels d'ammoniums quaternaires. Les études de LAWRENCE (40) sur les chlorures de diméthyl-alcoyl-benzyl-ammoniums ont montré que les germes à gram-négatif sont plus résistants que les germes à gram-positif.

Le fait que les ammoniums quaternaires sont capables de rendre gram-négatif les microbes normalement gram-positif permettra sans

doute, à partir de ces expériences, de préciser les constituants de la membrane qui sont responsables de cette action (H. RENAULT) (53).

L'effet bactéricide des agents tensio-actifs sur le bacille tuberculeux, étudié par SMITH et Coll. (58) s'est révélé très faible. Il semble bien que le bacille de Koch soit très résistant aux sels d'ammoniums quaternaires.

A ces variabilités d'action près la plupart des ammoniums en vente dans le commerce sont bactéricides pour les germes à des concentrations comprises entre 1/15.000 et 1/80.000 après 10 minutes de contact à la température de 20°. Cette activité se révèle être 5 à 10 fois supérieure à celle du bichlorure de mercure et 100 fois supérieure à celle de l'acide phénique.

A. Techniques d'évaluation du pouvoir bactéricide des Ammoniums Quaternaires.

1°/ — *Technique de LAMBIN* (39) — 1933.

Cette méthode consiste dans la mesure du *pouvoir antigénétique* d'une substance vis-à-vis des bactéries. Le pouvoir antigenétique d'une substance vis-à-vis d'un microbe donne est la faculté que possede cette substance de suspendre temporairement la vie de ce germe ou de s'opposer à son développement dans un milieu où se trouvent réalisées les conditions optima.

On le représente par la *dose antigénétique*, c'est-à-dire par la dose de cette substance qu'il suffit d'ajouter à 1 litre de bouillon de culture pour y empêcher le développement d'une quantité connue (10 millions par cm^3) de ces germes, dans des conditions favorables déterminées.

Détermination de la dose antigénétique.

On calcule à l'avance, d'une part, les quantités de solution désinfectantes à mettre en expérience et, d'autre part, la quantité de suspension microbienne à introduire dans le milieu pour y assurer une concentration en germes de 10 millions au cm^3.

On dispose d'une série de tubes à essai contenant chacun 2,5 cm^3 de bouillon peptoné salé. On y ajoute la quantité de suspension microbienne suffisante pour apporter dans chaque tube 50 millions de germes, puis, aussitôt après, des quantités croissantes

de la solution antiseptique étudiée. On complète alors au volume constant de 5 cm^3 avec de l'eau distillée stérile. On agite chaque tube.

On dispose généralement de tubes de bouillon contenant 10 millions de germes par cm^3 et des quantités croissantes d'antiseptique. On laisse les tubes 15 jours à la température du laboratoire, au bout de ce temps les substances ont exercé leur action antigénétique. On place à l'étuve à 37° pendant 4 jours. Au bout du 30me jour la lecture des résultats est effectuée. On note la dose de substance antiseptique contenue dans le dernier tube de la série qui a cultivé, et la dose contenue dans le tube suivant, c'est-à-dire dans le premier de la série restée stérile.

La moyenne des deux chiffres est considérée comme la dose antigénétique du produit.

L'expérience est effectuée avec les espèces bactériennes suivantes : *Staphylocoque, Colibacille, bacilles typhiques, Bacillus subtilis.*

2°/ — *Technique de KLARMANN et WRIGHT* (33) — 1948.

Cette méthode nécessite la préparation d'un milieu spécial destiné à neutraliser les phénomènes de bactériostase qui interviennent au cours de l'action des ammoniums quaternaires, le *Bacto-Oxgall-Média.*

Préparation du Bacto-Oxgall-Média.

Si l'on utilise l'*E. typhosa* comme germe-test le milieu doit contenir 10 g. de peptone, 5 g. d'extrait de viande de bœuf, 10 g. de bacto-oxgall pour 1.000 cm^3 d'eau distillée.

Porter ce mélange à ébullition. Ajuster le pH à 7,4. Ajouter ensuite 5 g. de « super-sel ». Filtrer pendant que le mélange est encore chaud. Ajouter 5 g. de dextrose. Répartir en tubes de 20 cm^3. Porter à l'autoclave pendant 1/2 heure.

Technique expérimentale :

Introduire 0,5 cm^3 de culture d'E. typhosa en bouillon dans des tubes stériles en évitant de toucher les parois du tube. Placer les

tubes au bain-marie à 20°. Prélever 0,5 cm^3 du désinfectant à tester lui-même dilué et porté à 20°. Les introduire dans chacun des tubes contenant le bouillon de culture. Mélanger soigneusement. Dix minutes après verser aseptiquement 20 cm^3 du bouillon Bacto-Oxgall dans chacun des tubes. Laisser incuber 48 heures à 37°. Noter la croissance ou l'inhibition.

3°/ — *Technique de BUTTERFIELD - WATTIE - CHAMBERS* (9) — 1950.

Cette méthode mesure l'activité antiseptique du produit en faisant une numération des germes vivants dans une suspension d'*Escherichia coli* après une exposition d'une minute à l'agent antiseptique évalué.

4°/ — *Technique de BEGNINO* et *BERTI* (8) — 1951.

Ces auteurs déterminent la quantité minimum nécessaire pour tuer un nombre de bactéries donné. Les expériences sont faites sur le bromure d'alkyl-triméthyl-ammonium (CTAB).

Parmi d'autres techniques permettant d'évaluer le pouvoir bactéricide des sels d'ammoniums quaternaires il faut citer la méthode d'EGGENBERGER et Coll. (20) basée sur la mesure de la conductibilité au cours des mécanismes bactéricides, celle de NUNGESTER et KEMPF appelée « test de prévention d'infection », et celle de BREWER, test irritatif sur l'œil de l'animal.

B. Concentrations d'Ammoniums Quaternaires nécessaires pour tuer les bactéries.

Nous rapportons ci-dessous les résultats des travaux de VALKO - DUBOIS sur l'activité bactéricide des chlorures de diméthyl-alcoyl-benzyl-ammonium et de QUISNO - FOTER sur le chlorure de cétyl-pyridinium, mentionnés dans l'important article de J. RENAULT (52).

1°/ — *Travaux de VALKO - DUBOIS* (62).

Activité bactéricide des chlorures de diméthyl-alcoyl-benzyl-ammoniums.

$$C_6H_5CH_2 - \overset{\overset{CH_3}{|}}{\underset{\underset{CH_3}{|}}{N^+}} - R - Cl^-$$

R	STAPHYLOCOCCUS AUREUS		EBERTHELLA TYPHOSA	
	Concentration (°)	Activité relative	Concentration	Activité relative
n — C_8 H_{17}	1 : 170	0,8	1 : 280	1,3
n — C_{10} H_{21}	1 : 900	4,3	1 : 1.000	4,7
n — C_{12} H_{25}	1 : 20.000	95	1 : 16.000	71
n — C_{14} H_{29}	1 : 21.000	100	1 : 17.000	81
n — C_{16} H_{33}	1 : 14.000	67	1 : 11.000	52
n — C_{18} H_{37}	1 : 5.000	24	1 : 7.000	33
n — $\triangle$ — 9 C_{18} H_{35}	1 : 29.000	140	1 : 10.000	47

$$CH_3 - \overset{\overset{R}{|}}{\underset{\underset{R_1}{|}}{N^+}} - C_{12}\,H_{25}\;Cl^-$$

R	R_1	STAPHYLOCOCCUS AUREUS		EBERTHELLA TYPHOSA	
		Concentration (°)	Activité relative	Concentration	Activité relative
CH_3	C_6H_5 CH_2	1 : 20.000	95	1 : 16.000	71
CH_3	CH_3	1 : 6.500	31	1 : 5.000	24
CH_3	C_2H_5	1 : 7.700	37	1 : 5.800	28

(°) — concentration détruisant les germes en 10' et non en 5 minutes à 20°.

2°/ — *Travaux de QUISNO - FOTER* (51) *sur le chlorure de cétyl-pyridinium.*

Activité bactéricide du chlorure de cétyl-pyridinium en solution aqueuse (concentration détruisant les germes en 10, mais non en 5 minutes à la température de 35°).

GERMES	CONCENTRATION
Streptococcus hemolyticus	1 : 127.500
Diplococcus pneumoniæ	1 : 95.000
Neisseria catarrhalis	1 : 84.000
Staphylococcus aureus	1 : 83.000
Staphylococcus albus	1 : 73.000
Corynebacterium diphteriæ	1 : 64.000
Streptococcus viridans	1 : 42.500
Shigella sonne	1 : 68.000
Escherichia coli	1 : 66.000
Shigella dysenteriæ	1 : 60.000
» paradysenteriæ (FLEXNER)	1 : 52.000
» paradysenteriæ (HISS)	1 : 49.000
Eberthella typhosa	1 : 48.000
Proteus vulgaris	1 : 34.000

Sur le plan des applications pratiques de ces données, divers auteurs (MULLS - FOOTS (46), DUBOIS - DIBBLEE (17) ont cherché à remédier à l'altération du lait par l'addition d'ammoniums

quaternaires. Ces altérations peuvent résulter de la manipulation du lait dans des récipients malpropres ou d'une conservation à une température trop élevée.

D'après les travaux de DUBOIS - DIBBLEE (17), on constate que dans un lait pasteurisé 40 mg. de « Roccal » (chlorure de diméthyl-alcoyl-benzyl-ammonium) par litre suffisent à retarder la coagulation pendant 24 h., même s'il est conservé à 35°.

Dans le cas d'un lait riche en germes, mais conservé dans des conditions normales, il faut porter la concentration à 250 mg. par litre — seuls résistent alors les germes à gram-négatif.

Si le lait est mal recueilli et mal conservé, des concentrations de *1 et même 2 grammes* se révèlent inopérantes.

Ces doses très nettement supérieures à celles indiquées plus haut indiquent que l'activité antimicrobienne des ammoniums quaternaires est diminuée en présence de matières organiques. Elle reste cependant bien supérieure à celle de la plupart des antiseptiques alimentaires connus à ce jour.

ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE

Définition :

On appelle bactériostatique une substance susceptible d'inhiber le développement des bactéries en empêchant leur multiplication.

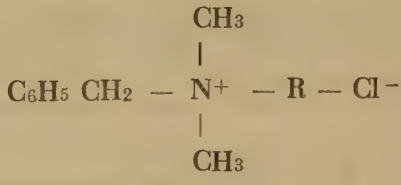
Le pouvoir bactériostatique d'un produit s'évaluera par la plus grande dilution pouvant arrêter la multiplication des germes dans un milieu nutritif normal (bouillon de viande peptoné et glucosé).

L'action bactériostatique des sels d'ammoniums quaternaires est extrêmement élevée.

D'une manière générale elle se manifeste à des concentrations variant de quelques milligrammes à quelques centigrammes par litre, alors que celle du phénol est de l'ordre de 2 à 3 grammes.

Le pouvoir bactériostatique de quelques chlorures de diméthyl-alcoyl-benzyl-ammoniums sur les germes a été étudié par LAWRENCE (40). On remarque ici encore que les germes à gram-négatif sont plus résistants que les germes à gram-positif.

Pouvoir bactériostatique des chlorures de diméthyl-alcoyl-benzyl-ammoniums d'après LAWRENCE (40).



R	n — $C_{16}H_{33}$	n — $C_{18}H_{37}$	" Laurol "
Staphylococcus aureus	1 : 400.000	1 : 50.000	1 : 800.000
Staphylococcus pyogenes	1 : 1.600.000	1 : 800.000	1 : 800.000
Diplococcus pneumoniæ	1 : 800.000	1 : 800.000	1 : 200.000
Clostridium Welchi	1 : 400.000	1 : 25.000	1 : 200.000
» histolyticum	1 : 400.000	1 : 100.000	1 : 200.000
» ædematicus	1 : 200.000	1 : 25.000	1 : 200.000
Plectridium tetani	1 : 400.000	1 : 100.000	1 : 200.000
Eberthella typhosa	1 : 256.000	1 : 16.000	1 : 256.000
Escherichia coli	1 : 256.000	1 : 4.000	1 : 64.000
Shigella dysenteriæ	1 : 128.000	1 : 32.000	1 : 512.000
Salmonella paratyphi	1 : 32.000	1 : 4.000	1 : 64.000
Salmonella enteridis	1 : 16.000	1 : 4.000	1 : 32.000
Proteus vulgaris	1 : 16.000	1 : 8.000	1 : 16.000

ACTIVITÉ FONGICIDE

On appelle fongicide toute substance provoquant la mort d'un champignon parasite de l'espèce végétale ou animale.

L'activité antifongique des sels d'ammoniums antiseptiques est moins sûrement établie que leur pouvoir bactéricide. En 1938 DUNN (19) remarquait déjà que les champignons sont moins sensibles aux ammoniums quaternaires que les bactéries. KLARMANN et WRIGHT (32), enquêtant en 1946 sur le pouvoir germicide des agents tensio-actifs, se demandaient si ces composés étaient vraiment fongicides.

Il est certain en tout cas que les doses nécessaires à la destruction des champignons sont sensiblement supérieures à celles suffisantes pour tuer les bactéries.

Le « Roccal » serait l'un des dérivés les plus actifs : des concentrations de cet agent variant de 1/5.000 à 1/100.000 détruisent à 20° en 10 minutes certains champignons saprophytes des aliments.

Il faut à peu près les mêmes concentrations de « Désogène » pour traiter efficacement les vulvo-vaginites mycosiques causées par le Candida albicans (Berk), le Candida kruzei (Berk) ou le Candida tropicalis (Berk) (GRASSET) (26).

L. KOEBE-AMIN (36), F. PELLISSIER — P. BERNARD — L. KOEBE — A. RUSSO (47) ont montré dans leurs travaux sur la levure de bière que le « Désogène » inhibe totalement le développement du Saccharomyces cerevisiæ (Hans) à une concentration de 5/100.000.

Dans leurs expériences faites sur les levures intervenant au cours de la fermentation vinaire et sur les moisissures vertes ou blanches qui apparaissent spontanément sur les milieux septiques, ils notent :

Pour de faibles concentrations de « Désogène » (0,02/1.000 et 0,03/1.000)

- — une fermentation normale,
- — la présence de petites colonies d'Aspergillacées.

Pour des concentrations moyennes de « Désogène » (0,12/1.000 à 0,28/1.000)

- — un retard de la fermentation,
- — de très abondantes colonies de champignons saprophytes.

Pour des concentrations fortes de « Désogène » (0,32/1.000 à 1,20/1.000)

— une fermentation très faible,
— un mycelium saprophyte beaucoup moins abondant que dans les concentrations moyennes.

Dans leurs expériences sur les Aspergillacées ces auteurs remarquent que le pouvoir fongicide du « Désogène » s'établit pour une concentration de 2,40/1.000.

Quant au Mycoderma aceti (Past), son développement est totalement inhibé à une concentration de 1/1.000 de « Désogène ».

Parmi les champignons, les levures paraissent donc assez sensibles — Saccharomyces cerevisiæ (Hans), ellipsoïdus (Hans), pastorianus (Hans), et exiguus (Hans) — les moisissures saprophytes, par contre, nécessitent l'utilisation de fortes doses.

On peut affirmer en résumé que le pouvoir fongicide des ammoniums quaternaires est certain mais qu'il est moins précis et moins puissant que leur pouvoir bactéricide.

ACTIVITÉ FONGOSTATIQUE

Définition :

Fongostatique : substance capable d'inhiber la formation et la maturation des spores ou conidies qui assurent la dissémination de l'espèce.

Le terme de *fongostase* est appliqué suivant les auteurs au ralentissement du développement mycélien ou au ralentissement de la formation des pinceaux conidiens.

Le bromure de diméthyl-dodecy-carbetoxy-méthyl-ammonium est fongostatique vis-à-vis des Aspergillus, des Penicilliums et des Sterigmatocystis à des concentrations supérieures à 1 g. par litre.

Le « Désogène » stoppe le développement des Aspergillacées à la concentration de 1.20 pour mille. Il a une action fongostatique sur le Saccharomyces cerevisiæ à la concentration de 3,2/100.000.

F. PELLISSIER et L. KOEBE-AMIN (36) constatent dans leurs expériences sur la fermentation des moûts de raisin que de faibles doses de « Désogène » entraînent une action fongostatique incontestable bien qu'il soit curieux de constater que cette action est inversement proportionnelle aux doses de « Désogène » appliquées (*).

Par contre, des doses moyennes d'hydrate d'ammonium quaternaire, suffisantes pour inhiber le développement des moisissures de la fermentation, sont sans action fongostatique sur la croissance mycelienne et l'édification de l'appareil conidien des Aspergillacées saprophytes.

Avec des concentrations plus fortes de « Désogène » les auteurs précédents notent que la fermentation est pratiquement arrêtée et que la croissance du mycelium parasite est beaucoup moins importante. L'activité fongostatique du « Désogène » se précise ici car c'est au seul ammonium quaternaire que nous devons l'inhibition partielle du développement mycelien et de la construction du système de multiplication asexuée.

Dans les cas présents, on constate donc que l'action fongostatique des sels d'ammoniums quaternaires se présente de la façon suivante :

Pour de *faibles* et de *fortes concentrations* de « Désogène » on observe la *présence d'un phénomène de fongostase;* par contre, pour des concentrations *moyennes* le mycelium et les conidies du champignon parasite restent remarquablement développés. Il n'y a donc pas dans ces conditions d'activité fongostatique.

ACTIVITÉ SPORICIDE

Une substance est sporicide lorsqu'elle est susceptible non seulement de causer la mort des bactéries, mais encore de détruire leurs spores, forme de résistance.

Il est très important de différencier cette action du pouvoir bactéricide. Un antiseptique tuant à une certaine dose tous les germes d'un milieu peut ne pas avoir d'action toxique sur les

(*) — Il est possible que la fermentation, par formation d'alcool et de CO^2, ajoute son action antiseptique à celle du Désogène. On sait en effet que l'alcool sensibilise l'action toxique des sels d'ammoniums quaternaires.

sporulées. Or certaines de ces spores sont très redoutables, celles du bacille botulique en particulier.

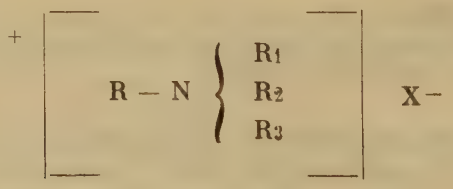
Peu sensibles à l'action léthale de la chaleur, les organismes sporifères paraissent résister aussi à l'action des sels quaternaires.

Dans les conditions optima de température (80 à 85°) et à divers pH, ces agents ne tuent pas toutes les spores de tous les échantillons (GURRANN - EVANS (28). Les composés d'ammoniums quaternaires, essayés à des concentrations supérieures à 10 °/° ne peuvent stériliser des organismes sporifères anaérobies tels que Clostridium Welchi, Clostridium tetani, et Clostridium sporogenes.

Les aérobies sporifères comme Bacillus anthracis résistent à une solution à 1 °/° de chlorure de benzalkonium (KLARMANN et WRIGHT (35). On constate que ces doses sont de beaucoup supérieures à celles nécessaires pour tuer les formes végétatives. Les ammoniums sont de médiocres sporicides. Il est donc indispensable de préciser l'activité sporicide d'un sel d'ammonium quaternaire puisque celle-ci est très *fortement inférieure* à son pouvoir bactéricide.

RELATIONS ENTRE LA FORMULE CHIMIQUE ET LE POUVOIR ANTISEPTIQUE DES SELS D'AMMONIUMS QUATERNAIRES

DOMAGK (16) a établi que tous les composés du type



peuvent être bactéricides pourvu qu'au moins l'un des radicaux soit une chaîne aliphatique comprise entre C_8 et C_{18}.

Incidence de la chaîne polyéthylénique.

Les composés possédant une chaîne à moins de 12 atomes de carbone sont peu actifs. L'activité augmente rapidement pour atteindre un palier obtenu avec la chaîne à 14 carbones (myristyle) puis décroît. Le maximum d'action est donné tantôt avec un radical lauryle, myristyle ou cetyle (SHELTON et Coll.) (56).

La présence d'une double liaison dans la chaîne aliphatique peut renforcer le pouvoir bactéricide. Par exemple, le chlorure de diméthyl-9-octadécényl-benzyl-ammonium est six fois plus actif vis-à-vis du Staphylococcus aureus que le dérivé correspondant.

La substitution d'un radical méthyle ou éthyle à un radical benzyle est souvent défavorable. La présence de 2 atomes de chlore en 3 et 4 dans le noyau benzénique augmente le pouvoir antiseptique.

Selon MASON - BROWN et MINGA (43), dans le cas des fongicides renfermant un ammonium quaternaire, la substitution en para est en général plus efficace que celle en ortho ou en méta.

ZISSMANN (64) remarque que les propriétés de certains sels d'ammoniums quaternaires dépendent des variations conjuguées de certains radicaux et du groupement polaire compris dans leur formule. L'activité de ces sels serait en rapport avec la structure générale de la molécule, tous les substituants sur l'azote étant interdépendants les uns des autres.

Dans le groupe des agents dérivés des pyridines substituées, le maximum d'activité est atteint lorsque la somme des atomes de carbone des groupements C alcoylés et N alcoylés est comprise entre 16 et 19. A l'intérieur de cette zone, l'activité dépend moins de la ramification, de l'isomérie de la position ou de la nature de l'anion.

Toxicité des Sels d'Ammoniums Quaternaires

Le problème de la toxicité des sels d'ammoniums quaternaires se présente sous deux aspects :

— *la toxicité aiguë,* provoquée par l'ingestion accidentelle d'une dose massive de produit,

— *la toxicité chronique,* dont les phénomènes peuvent se manifester à la suite de l'absorption régulière par un individu de faibles quantités d'ammoniums quaternaires, contenues par exemple dans un aliment.

TOXICITÉ AIGUE

« On admet qu'aux concentrations employées communément, les sels d'ammoniums quaternaires antiseptiques ne sont pas toxiques pour les animaux supérieurs » (LECHAT) (41).

Les seuls accidents graves mentionnés dans la chronique des empoisonnements par les ammoniums quaternaires sont dus à des doses relativement fortes.

ADELSON (1) signale un cas d'intoxication mortelle chez l'homme avec 15 grammes de « Zephirol ». Par contre FLOTOW (23) note un suicide manqué par l'absorption de 50 grammes du même produit.

On voit donc que la dose mortelle pour l'homme n'est pas connue avec une grande précision.

Sur le plan expérimental, des études sur le lapin et le cobaye ont permis d'établir une dose léthale moyenne (DL 50) de l'ordre de 300 à 500 mg per os et par kg.

D'après BECHER (7), les doses léthales moyennes pour le lapin, le cobaye et la souris atteignent respectivement 10, 30, 200 mg par kilo lorsqu'elles sont introduites par voie péritonéale, par voie intraveineuse, ou par voie sous-cutanée.

Mécanisme de l'intoxication.

Les données actuelles sur ce point restent encore assez vagues.

D'après les travaux de STEWART (60), les effets toxiques des sels quaternaires simuleraient une avitaminose. SCHWARTZ (55) note une mort brutale après ingestion d'une solution de bromure de tetra-ethyl-ammonium (TEAB) par hypotension forte et subite.

ADELSON et SUNSHINE (1) pensent que l'empoisonnement mortel serait dû à une inhibition de la cholinestérase et des enzymes d'oxydation intra-cellulaire.

KEITH (31) admet que la mort serait consécutive à l'arrêt du centre respiratoire.

Enfin la majorité des auteurs est d'accord pour penser que les ammoniums quaternaires exercent à des doses toxiques une action curariforme. BECHER et Coll. (7) — CHAIGNEAU (10).

Nous nous sommes arrêté à cette explication qui met en évidence les rapports unissant du point de vue chimique les sels antiseptiques à la grande famille des ammoniums quaternaires utilisés en thérapeutique.

Rappelons brièvement l'action physiologique de ces derniers composés. Leur propriété pharmacodynamique est complexe et contradictoire.

Ils exercent en même temps des actions :

— *muscarinique,*
— *nicotinique stimulante,*
— *nicotinique paralysante,*
— *curarisante,*
— *décurarisante,*
— *et atropinique.*

(DALLEMAGNE (14).

Les dérivés de l'ammonium quaternaire agissent principalement au niveau des structures qui sont le siège d'une fonction cholinergique. A cause de leur parenté chimique avec l'acetylcholine, la plupart de ces dérivés sont pharmacologiquement actifs au niveau des synapses cholinergiques et des jonctions neuro-effectives.

Parmi ces corps il faut citer le curare, qui représente la substance type capable de réaliser l'interruption de la transmission neuro-musculaire, le flaxedil, l'iodure de décamethonium, les sels d'alkyl-triméthyl-ammonium, etc...

TOXICITÉ CHRONIQUE

Certains auteurs américains, FINNEGAN (21) — ALFREDSON (2) — FITZHUGH (22), alarmés par l'importance que prennent chaque année aux Etats-Unis les sels d'ammoniums quaternaires, ont entrepris l'étude expérimentale de la toxicité de ces nouveaux antiseptiques.

Tous admettent que leur emploi dans les industries alimentaires, les restaurants, les laiteries, risquent de provoquer des intoxications chroniques graves.

Ces produits, utilisés pour le nettoyage et l'épluchage des légumes et des fruits destinés à l'empaquetage peuvent, au cours des manipulations, donner des troubles cutanés et irriter les muqueuses. Leur utilisation en antiseptie externe n'est d'ailleurs pas sans danger, comme l'a montré CRUICKSCHANK (13) qui note dans certains cas des éruptions cutanées s'accompagnant parfois d'éosinophilie.

Etudes expérimentales.

Un certain nombre d'expériences ont été entreprises sur les animaux (chiens, chats, rats, souris, etc...).

Parmi les plus importantes notons celles d'ALFREDSON et Coll. (2). Ces auteurs ont prouvé que tous les animaux n'étaient pas également sensibles aux ammoniums quaternaires. C'est ainsi que le chlorure d'alcoyl-diméthyl-benzyl-ammonium a une toxicité plus grande pour le chien que pour le rat. Ils n'ont observé aucune toxicité pour des concentrations inférieures à 0,25 °/° du régime des rats et à 0,12 °/° de celui des chiens. A des doses supérieures ils notent une irritation du tractus gastro-intestinal s'accompagnant de diarrhée, d'inappétance et d'un état de dépression générale.

Les expériences de FITZHUGH et NELSON (22) sur les rats ont duré deux ans.

Ils administrèrent per os à des lots de rats :

— du chlorure d'alkyl-diméthyl-benzyl-ammonium
— du dioctyl-sulfosuccinate de soude
— et du lauryl-sulfate de soude.

Ils mélangèrent à la nourriture des animaux les doses suivantes de produits :

— 0,25 — 0,5 et 1 °/° de lauryl-sulfate de soude
— 0,25 — 0,5 et 1 °/° de dioctyl-sulfosuccinate de soude
— 0,063 — 0,125 — 0,25 et 0,50 °/° de chlorure d'alkyl-diméthyl-benzyl-ammonium.

Ce dernier composé a un degré de toxicité particulièrement élevé.

Dans l'ensemble ces auteurs notent des effets sur la croissance et la mortalité et des modifications du tractus gastro-intestinal avec ascite et diarrhée.

Le chlorure d'alkyl-diméthyl-benzyl-ammonium est toxique pour les rats à la concentration de 0,063 °/° ou plus dans le régime. A une concentration de 0,5 °/° tous les rats meurent en 10 semaines. A une concentration de 0,063 °/° deux animaux montrent des lésions histopathologiques et une nette diminution de la croissance.

Le dioctyl-sulfosuccinate de soude provoque, à la concentration de 1 °/° un retard sensible de la croissance des rats mais ne donne pas de lésions histopathologiques. Quant au lauryl-sulfate de soude, il n'est pas toxique à des concentrations de 1 °/° ou moins dans le régime des animaux.

Dans une seconde série d'expériences d'une durée de 4 mois, FITZHUGH et NELSON étudient l'action de ces mêmes produits à des concentrations plus fortes. Ils expérimentent en même temps deux autres produits, l'alkyl-aryl-sulfonate de soude et le poly-éthylène-glycol.

Avec 4 °/° de lauryl-sulfate de soude ils observent une nette diminution de la courbe de croissance des rats, de même qu'avec 2 °/° d'alkyl-aryl-sulfonate de soude et de poly-éthylène-glycol.

La mort survient pour tous les animaux à des concentrations de 4 °/° d'alkyl-aryl-sulfonate de soude, ou de 8 °/° de dioctyl-sulfosuccinate de soude, ou de 8 °/° de lauryl-sulfate de soude.

Tous les effets toxiques étudiés au cours de ces expériences s'accompagnent d'une grande distension des intestins, de diarrhée et d'une irritation du tractus gastro-intestinal.

Notons enfin, d'après POLONOVSKI (50), que certaines oxydases comme la cytochrome oxydase sont inactivées par les sels d'ammoniums quaternaires. Il en est de même de l'amylase salivaire et de la trypsine. L'activité protéolytique de la pancréatine est également diminuée par la présence d'ammonium. L'absorption régulière de ces antiseptiques peut donc entraîner des troubles digestifs.

Nous voyons d'après cette série d'expériences que les hydrates d'ammoniums quaternaires ne sont pas dénués de toute toxicité. Cependant, de nombreuses données manquent encore pour établir avec précision le degré de leur nocivité.

Nous ignorons en particulier quelles sont les modifications qu'ils peuvent apporter dans la formule sanguine ou dans l'aspect général de la flore intestinale. Or, d'après LECHAT (41) : « l'absorption chez l'homme d'ammoniums quaternaires antiseptiques risque, en inhibant sélectivement certains microbes, d'entraîner un déséquilibre de la flore intestinale normale ».

Le but de notre travail sera, en grande partie, d'apporter quelques précisions sur cette importante question.

Recherche et dosage des Sels d'Ammoniums Quaternaires antiseptiques

Nous avons vu que les cuves, les fûts et les bidons employés dans les industries de la bière, du vin et du lait doivent être soigneusement rincés puisque la législation française proscrit la présence de tout antiseptique dans les denrées alimentaires. Si le rinçage est insuffisant il y a possibilité de fraude, qui peut être due à une simple négligence et qu'il appartient au chimiste de révéler.

Deux grandes techniques de recherche et de dosage ont été mises au point dans ce but.

— *Méthode de dosage par voie chimique colorimétrique, fondée sur les travaux d'AUERBACH* (3) (4).

— *Méthode de dosage biologique* à l'aide de souches microbiennes sensibles ou résistantes aux ammoniums quaternaires.

A. MÉTHODE DE DOSAGE PAR VOIE CHIMIQUE.

HARTLEY et RUNNICLES (29) firent en 1938 le premier essai de dosage chimique des sels quaternaires à longue chaîne aliphatique. Ces chimistes observèrent que le bromure de cétyl-pyridinium modifiait la couleur de la forme alcaline d'un colorant anionique du type phénol-sulfone-phtaléine. C'est ainsi que le bleu de bromophénol (tétra-bromo-phénol-sulfone-phtaléine) passe du violet au bleu franc en présence de quelques dixièmes de milligrammes de cétyl-pyridinium.

Cette observation fut le point de départ de la méthode mise au point par AUERBACH (3) en 1943. Son principe est le suivant :

Certains colorants hydrosolubles, tels le bleu de bromophénol, l'éosine, le rouge congo, etc... se combinent aux ammoniums quaternaires pour former des composés colorés insolubles dans l'eau mais très solubles dans les solvants organiques. La réaction se fait par la combinaison de deux molécules d'ammonium avec une molécule de colorant. Il y a alors double décomposition entre le sel disodique, la tétra-bromo-sulfone-phtaléine et l'ammonium. Les deux cations d'ammonium remplacent les deux atomes de sodium pour former un nouveau sel d'ammonium à anion colorée.

$$\text{Phtaléine} \begin{cases} \text{ONa} \\ \text{ONa} \end{cases} + 2\,R^+ X^- = \text{Phtaléine} \begin{cases} \text{OR} \\ \text{OR} \end{cases} + 2\,\text{ClNa}$$

violet ⟶ Bleu

Le nouveau sel formé est insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques.

Si on agite un liquide aqueux additionné de bleu de bromophénol avec un colorant organique, le colorant reste dans la phase aqueuse. Si on ajoute à cette solution aqueuse une certaine quantité de sel d'ammonium quaternaire et que l'on agite avec un solvant organique, la combinaison colorant - ammonium se fait et le sel formé passe dans le solvant qui se colore en bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'ammonium introduite. Si la quantité de colorant est supérieure à celle qui peut entrer en combinaison avec le sel quaternaire les deux phases restent colorées.

AUERBACH employa d'abord (1943) (3) comme solvant le dichloréthylène, mais devant les difficultés rencontrées pour l'obtenir anhydre le remplaça ensuite (1944) (4) par le benzène.

La réaction se fait en présence de carbonate de soude en quantité déterminée et le dosage se termine par colorimétrie à l'électrophotomètre, AUERBACH ne donne aucune précision de pH.

Cette méthode fut améliorée en 1946 par WILSON (63). Cet auteur pense qu'il faut procéder à l'élimination préalable des inhibiteurs de la réaction, tels les savons et les graisses. Pour cela il procède à un entraînement à la vapeur d'eau ou à une extraction par l'éther de pétrole en milieu acide. Il note que la sensibilité de la réaction peut permettre de déceler jusqu'à 0,01 mg d'ammonium dans 25 cm^3 de lait.

COLICHMAN (11) en 1947 apporte une modification importante à la technique d'AUERBACH en supprimant les solvants organiques. Il utilise une quantité fixe de bleu de bromophénol dont la solution est colorimétrée à pH déterminé. Il définit le « critical micelle concentration » comme étant la concentration limite d'ammonium quaternaire à partir de laquelle il y a formation de micelle.

En 1951 PIEN et ses collaborateurs (48), améliorant la méthode d'AUERBACH dressent une étude précise de la recherche des ammoniums quaternaires dans les laits.

Dans le cas du lait, le dosage ne peut se faire qu'après élimination préalable de la caséine, les ammoniums quaternaires étant très facilement absorbés par les protéines. La floculation qui se produit entraîne la plus grande partie de ces composés, le complexe ammonium - colorant ne peut se former, le solvant n'extrait pratiquement rien. Il faut donc rompre la liaison ammonium quaternaire-protéine par coagulation de la caséine. Pour cela, PIEN ajoute à la prise d'essai 20 cm^3 d'une solution d'acide acétique à 1 °/°. Puis il porte à ébullition pour coaguler l'albumine, il concentre la solution au bain-marie bouillant jusqu'à l'obtention d'un résidu de 1 à 2 cm^3. Il reprend par quelques cm^3 d'eau distillée et ajoute 5 cm^3 d'une solution de bicarbonate de soude à 10 °/°. Le précipité formé est lavé à plusieurs reprises sur un filtre plat. Le filtrat, les eaux de lavage et les eaux de rinçage sont recueillies dans une ampoule à décantation.

PIEN se sert du chloroforme comme solvant. Il en introduit 10 cm^3 exactement mesurés dans l'ampoule puis il ajoute 1 cm^3 de bleu de bromophénol. Il agite doucement puis laisse reposer une heure. Si la couche de chloroforme reste incolore c'est que le lait ne contenait pas d'ammonium quaternaire. Si la couche se colore c'est qu'il y avait une certaine quantité d'ammonium dans le lait.

Il recueille alors dans un tube de centrifugeuse la presque totalité de la couche de chloroforme colorée. Après centrifugation il examine la phase chloroformique à l'électrophotomètre en lumière jaune.

Le résultat obtenu sera comparé à une courbe d'étalonnage de l'appareil, établie suivant la même technique, en partant de laits à teneur connue en ammoniums quaternaires.

Cette méthode, convenablement exécutée, permettrait de déceler jusqu'à *5 parties par million* d'ammonium quaternaire dans le lait.

Que faut-il penser de cette technique de recherche des sels d'ammoniums quaternaires ?

Tout d'abord la réaction au bleu de bromophénol est-elle vraiment sélective de ses composés ?

D'après certains travaux entrepris il semble que la réaction d'AUERBACH soit spécifique de la fonction ammonium quaternaire. En effet ni les alcaloïdes, ni les amines ne réagissent dans les conditions requises et les essais à blanc pratiqués sur diverses denrées alimentaires dépourvues d'ammonium quaternaire ont toujours donné des résultats négatifs.

Mais, en appliquant cette technique à toute une série de composés dont il dresse un tableau, BADINAND (5) obtient un résultat positif avec la *paludrine*, ce qui laisse croire que la réaction d'AUERBACH ne serait pas spécifique.

AUERBACH et PIEN ne donnent aucune précision de pH. GOTTLIEB (25) signale le premier cette lacune en montrant l'importance de l'ajustage méticuleux de l'acidité dans le dosage colorimétrique des ammoniums quaternaires.

COLICHMAN (11) signale l'importance de l'erreur due à l'évaporation et à la difficulté de mesurer exactement les solvants organiques.

Enfin la précision du dosage est fonction de l'élimination préalable de tous les inhibiteurs de la réaction (savons, graisses, etc.).

Dans l'ensemble, en dépit de sa complexité, la méthode colorimétrique peut donner des résultats satisfaisants. Cependant, dans les cas les plus défavorables, l'erreur, toujours par défaut, peut atteindre 50 °/°.

A côté de la méthode colorimétrique il faut signaler une tentative de dosage volumétrique selon le principe de MILLER et ELLIKER (44).

Formation d'un sel à anion coloré entre l'ammonium et le bleu de bromophénol ou l'éosine. Ce sel est mis en contact avec un anion alcoyl-sulfate à longue chaîne. L'affinité de l'ammonium pour celui-ci étant supérieure à celle de l'anion coloré, il y a élimination de ce dernier et possibilité de titrer volumétriquement le sel quaternaire.

Cette méthode a été appliquée par MILLER et ELLIKER au dosage des ammoniums dans le lait. Ils opèrent sans élimination des protéines. Les résultats semblent moins précis et moins constants qu'avec la technique de PIEN.

B. MÉTHODE DE DOSAGE BIOLOGIQUE.

Nous avons vu que la méthode chimique était précise mais longue et délicate. Le but du dosage biologique est essentiellement

d'orienter la recherche et de permettre de dépister les échantillons suspects qui pourront subir par la suite un examen chimique.

On doit à PIEN, LIGNAC et CLAUDE (49) la mise au point d'une détection biologique des antiseptiques dans le lait.

Technique :

Les antiseptiques ont la faculté de pouvoir inhiber l'action fermentaire des bactéries et des levures. On ensemence un lait avec une quantité connue d'un ferment lactique. On compare l'acidification de cet échantillon à celle d'un échantillon de lait exempt de tout antiseptique, stérile, et traité dans les mêmes conditions. Si une différence notable est constatée dans la marche de l'acidification, on en déduira que le lait suspect renferme un facteur d'inhibition. On dose l'acidité avant le début de l'expérience, 4 h., 8 h. et 24 h. après.

Mode opératoire :

1./ — *Entretien de la souche de ferment lactique* (*).

La souche utilisée est une souche pure de *ferment lactique* du commerce. On l'entretient en faisant des repiquages quotidiens au moyen d'une ose dans dix ml de lait écrémé stérile. Les tubes de lait sont stérilisés à l'autoclave, à 120 °/° pendant 10 minutes. Les tubes ensemencés sont laissés à la température ordinaire (18° - 20°) pendant 24 h.

On peut interrompre le repiquage une fois ou deux par semaine à condition qu'il ait lieu régulièrement les autres jours.

Pour l'emploi on prépare une dilution d'une souche de 24 h. à raison de 0,1 cm^3 dans 10 cm^3 d'eau ou de lait stérile.

2./ — *Exécution de l'essai.*

Dans trois tubes stériles introduire aseptiquement 10 cm^3 de l'échantillon de lait suspect. Préparer d'autre part 3 tubes de lait stérile exempt d'antiseptiques contenant le même volume de lait (10 cm^3).

Ensemencer les 6 tubes à la pipette avec 0,1 cm^3 de la dilution de ferment au 1/100° préparée précédemment. Agiter les tubes et les placer dans l'étuve à 30°. Après 4 h., 8 h. et 24 h., titrer l'acidité du contenu d'un tube de lait et d'un tube de lait témoin.

(*) — Nous remercions ici vivement M. PIEN qui a bien voulu nous adresser les souches de Str. lactis sensibles et résistantes.

3./ — *Interprétation :*

Pour affirmer que le lait examiné est suspect il faut constater des différences d'acidité dans les tubes d'au moins 20 °/°.

Si l'écart entre le tube-témoin et le tube suspect est de l'ordre de 5 °/° on peut dire que le lait examiné ne renfermait aucun facteur d'inhibition. Une différence de 10 °/° peut laisser soupçonner la présence d'une substance retardatrice, naturelle ou non, mais à faible concentration et ne permet pas d'affirmer que l'on se trouve en présence d'une fraude.

On ne poursuivra l'examen que si l'écart, surtout dans les premières heures, est de l'ordre de 20 °/°.

Si le lait suspect n'est pas coagulé dans les 20 ou 24 h. on peut alors affirmer l'existence de facteurs d'inhibition actifs et abondants.

Cette première épreuve permet de détecter la présence dans un lait incriminé de facteurs d'inhibition de la fermentation lactique. Il faut maintenant essayer de déterminer à quelle classe ils appartiennent.

Distinction entre les facteurs d'inhibition naturels et les substances introduites frauduleusement dans le lait.

D'autres corps que les antibiotiques ou les antiseptiques, introduits frauduleusement dans le lait, sont susceptibles de gêner la fermentation lactique et de provoquer un retard de l'acidification. Ce sont des microorganismes (bactériophages par ex.) ou des substances antigéniques produites par l'animal à l'occasion d'une infection et passant directement dans le lait.

Il faut donc déterminer la classe à laquelle appartient le facteur inhibiteur dont on aura décelé la présence dans l'essai précédent.

Pour cela il faut opérer la recherche après avoir effectué un chauffage de 90° à 95° sur le lait. En effet les bactériophages et les bactéries, la plupart des substances antigéniques sécrétées par l'animal ne résistent pas à cette température. Pour éliminer ces facteurs d'inhibition naturels il suffira donc de plonger les trois tubes à essai stériles garnis de 10 cm^3 de lait suspect dans un bain-marie maintenu à la température de 95° pendant 30 secondes.

Détermination de la nature de l'antiseptique présent dans le lait.

L'étude de la résistance des ferments lactiques aux antiseptiques montre l'existence d'un seuil de toxicité. Au-dessous d'une certaine concentration la fermentation lactique se produit normalement. A partir d'une concentration qui correspond au seuil de toxicité la

fermentation est retardée proportionnellement à la concentration de l'antiseptique. Enfin pour une certaine concentration (dose inhibitrice) la fermentation lactique est complètement arrêtée.

Dans le cas particulier des sels d'ammoniums quaternaires le seuil de toxicité est atteint pour une dose de 0,002 g. par litre ; la dose inhibitrice pour une dose de 0,1 g. par litre.

Si on met en contact le ferment lactique avec une dose d'antiseptique légèrement supérieure au seuil de toxicité, on constate que la fermentation, d'abord retardée, finit, après plusieurs repiquages dans les mêmes conditions, par redevenir normale. Le ferment semble s'accoutumer à supporter une dose légèrement toxique et continue de proliférer.

On peut poursuivre l'expérience par des repiquages successifs en augmentant progressivement la dose d'antiseptique. Le ferment présente alors une résistance non seulement dans la dose de toxicité mais aussi dans des zones de concentrations qui étaient totalement inhibitrices au départ.

PIEN a constaté que la résistance acquise était spécifique et qu'elle s'entretenait par des repiquages réguliers de la souche. Au bout de plusieurs mois et même de plusieurs années il obtient des souches de ferment lactique résistant aux divers antiseptiques et devenues capables de produire une fermentation normale dans des laits contenant plusieurs fois la dose inhibitrice.

Le dépistage se fera de la façon suivante : plusieurs échantillons de lait suspects seront ensemencés, chacun dans l'une des souches résistantes aux divers antiseptiques, et soumis à l'incubation. Toutes les souches seront inhibées sauf celle qui est entraînée à résister à l'antiseptique présent.

Détermination de la concentration de l'antiseptique présent dans le lait.

Principe de la méthode :

PIEN ensemence le lait avec une série de souches entraînées à résister à diverses concentrations d'antiseptiques. La fermentation sera inhibée uniquement dans la souche entraînée à une certaine concentration et non pas dans la souche entraînée à une concentration supérieure.

On a ainsi la possibilité d'un dosage approximatif dont la précision n'est en fait limitée que par le nombre de souches entraînées dont on dispose.

Tableau des souches de ferments lactiques résistant aux antiseptiques

NATURE DE L'ANTISEPTIQUE	seuil de toxicité g./l.	dose inhibitrice g./l.	Concentrations en gr. par litre auxquelles résistent : souche A	souche B	souche C	souche D
Acide borique	0,6	3,0	1,0	2,0	3,0	4,6
Borate de soude	1,0	3,0	1,50	2,50	3,0	5,4
Acide benzoïque	0,4	1,0	0,60	0,80	(1)	—
Benzoate de soude	0,5	3,0	1,0	1,60	(1)	—
Acide salicylique	0,2	1,0	0,60	0,750	(1)	—
Salicylate de soude	0,2	2,0	0,80	1,30	(1)	—
Fluorure de sodium	0,005	2,0	0,50	1,250	2,0	2,35
Formol	0,015	0,3	0,080	0,120	(1)	—
Eau oxygénée (10 vol.)	0,5 cc	5,0 cc	1,0 cc	3,0 cc	5,0 cc	6,0 cc
Eau de Javel (12 vol.)	0,8 cc	3,0 cc	3,0 cc	10,0 cc	20,0 cc	(1)
Ammonium quaternaire	0,002	0,1	0,010	0,05	0,1	0,250
Aryl-alkyl-sulfonate à 20 %, TEEPOL	4,0 cc	20,0 cc	9,0 cc	10 cc	(1)	—

(1) — souches ne résistant pas encore à la dose d'inhibition totale, mais en cours d'entraînement.

Exemple de désignation des couches.

2 C est la souche résistante à 3 gr. de borate de soude par litre de lait.

6 B est la souche résistante à 1,3 gr. de salicylate de soude par litre de lait.

Les souches les plus résistantes sont celles de la série D (ou de la série C ou B lorsque la concentration correspondante n'a pas encore pu être dépassée.

Préparation du lait antiseptique.

Des tubes de 10 cm^3 de lait écrémé stérile sont additionnés chaque jour (immédiatement avant l'ensemencement) de quantités convenables de solutions antiseptiques, afin d'avoir dans le lait la concentration voulue.

Ensemencement et culture.

Les souches résistantes sont repiquées dans les tubes correspondants à raison de 1 °/° c'est-à-dire 0,1 cm^3 dans 10 cm^3 de lait et portées à l'étuve à 30°. Tous les tubes coagulent en moins de 24 h.

Les repiquages ont lieu tous les jours de la semaine sauf deux.

Le jour où les souches ne sont pas repiquées on les place à une température inférieure à + 10°.

Il a été reconnu qu'il est utile de faire passer les souches une fois par semaine en lait pur stérile. Leur résistance ne s'en trouve nullement diminuée.

En résumé la méthode de détection biologique des antiseptiques dans le lait comporte d'abord la mise en évidence de la présence éventuelle d'un facteur d'inhibition par l'ensemencement d'un ferment lactique quelconque et la comparaison de la fermentation obtenue avec celle d'un lait normal ensemencé du même ferment.

On procède ensuite à l'identification de cette substance en ensemençant plusieurs échantillons du lait suspect à l'aide de souches résistantes aux divers antiseptiques.

Seul l'échantillon ayant reçu la souche entraînée à résister à l'inhibiteur réellement présent sera le siège d'une fermentation normale. Les autres tubes ne donneront pas de fermentation.

Enfin connaissant la nature de l'antiseptique présent on pourra alors déterminer sa concentration approximative dans le lait suspect en faisant la même expérience avec différentes souches entraînées à résister spécifiquement à diverses concentrations de l'antiseptique.

CONCLUSION

La recherche et le dosage des sels d'ammoniums quaternaires est un problème délicat et complexe.

La *méthode chimique* fondée sur la réaction colorimétrique d'AUERBACH permet, en théorie, d'obtenir des résultats d'une assez grande précision. Mais nous avons vu qu'elle était sujette à de nombreuses erreurs dont les plus importantes sont celles de manipulation.

La *méthode biologique* de PIEN est certainement plus simple; elle est en tous cas d'une grande élégance, puisqu'elle permet d'abord de détecter la présence d'un antiseptique et ensuite, à l'aide de souches résistantes à des antiseptiques donnés, de caractériser celui qui est en cause.

Il semble en tous cas que *l'alliance des deux méthodes* constitue pour l'expert la meilleure des conditions, en permettant d'abord la détection de la présence éventuelle d'un antiseptique dans le lait par la méthode biologique, ensuite, le dosage chimique des ammoniums quaternaires si les premiers essais se sont révélés positifs.

RECHERCHES PERSONNELLES

Recherche et dosage des Sels d'Ammoniums Quaternaires dans les laits de la Région provençale

La première partie de notre étude nous a permis d'établir certaines constatations sur l'intérêt des différentes méthodes de recherche des sels d'ammoniums quaternaires.

Nous avons vu que la complexité du dosage chimique fondé sur la réaction d'AUERBACH (3) (4) rendait cette méthode assez délicate. Sa mise en œuvre nécessite un matériel assez important, elle est longue et surtout elle entraîne des erreurs possibles de manipulation.

Dans nos expériences nous l'avons utilisée en suivant la technique de PIEN - DESIRANT - ROCHELLE (48) pour établir une courbe d'étalonnage au photomètre électrique.

Nous sommes partis de laits à teneur connue en ammoniums quaternaires (« Désogène »). Nous avons mené de front plusieurs essais. Soit que la mesure du solvant organique n'ait pu se faire exactement, soit que l'ébullition, le rinçage et surtout l'évaporation au bain-marie aient entraîné des pertes importantes, les résultats que nous avons obtenus pour de mêmes concentrations ont été souvent éloignés les uns des autres.

Après l'établissement de cette courbe étalon nous avons entrepris un certain nombre de dosages. Ceux-ci ont été effectués sur 20 échantillons de lait pasteurisé conditionné provenant de divers ateliers de pasteurisation et pendant la période du 20 octobre au 10 décembre 1955.

Tous nos essais ont donné des résultats négatifs.

Nous avons pensé, étant donné la multiplicité des antiseptiques susceptibles d'être incorporés au lait, qu'il ne semblait pas indiqué de procéder directement à la recherche des sels d'ammoniums quaternaires par la méthode chimique.

Il est certainement préférable de mettre d'abord en évidence la présence éventuelle dans le lait d'un facteur d'inhibition naturel ou étranger que l'on décèlera par l'ensemencement d'un ferment lactique quelconque dans le lait suspect et par la comparaison de la fermentation obtenue à celle d'un témoin normal.

C'est là l'intérêt que présente la méthode de dosage biologique de PIEN - LIGNAC et CLAUDE (49) que nous avons décrite précédemment.

Nous avons vu qu'un chauffage à 95° au bain-marie permettait d'éliminer les facteurs d'inhibition naturels susceptibles de gêner la fermentation lactique dans le lait.

Cette précaution prise, on pourra procéder à l'essai de dépistage. Si l'on obtient une différence notable d'acidification entre le lait suspect et le témoin on pourra identifier la substance inhibitrice au moyen de souches entraînées à résister aux divers antiseptiques.

Titrage de l'acidité.

Le dosage se fait à l'aide de la soude N/10 en présence de phénol-phtaléine. Le virage étant délicat à apprécier il est indispensable pour obtenir des résultats comparables de procéder exactement de la même manière pour le lait suspect et pour le témoin.

Les erlenmeyers doivent avoir la même capacité, les quantités d'eau distillée servant à diluer le lait doivent être égales. Il est même préférable de préparer à l'avance un erlenmeyer témoin de même dimension contenant 10 cm^3 de lait et 50 cm^3 d'eau. On peut ainsi comparer au cours du dosage la teinte initiale de cette solution témoin au rosissement de l'essai.

Nous avons procédé, en suivant cette méthode, à une série de dosages d'acidité sur des laits de provenances différentes. Nous rendons compte des résultats obtenus dans le tableau suivant.

Les chiffres indiqués expriment le nombre de cm^3 de soude N/10 versés.

Tableau

		Nombre de ml. de soude N/10 versés			
		à 0 h.	6 h. après	8 h. après	24 h. après
1	Témoin	1	0,9	1	1,1
	Essai	1,4	1,3	1,5	1,8
2	Témoin	1	1,2	1,7	1,8
	Essai	1,5	1,6	1,8	2,2
3	Témoin	1,3	1,5	1,5	2,8
	Essai	1,4	1,5	1,5	3,5
4	Témoin	1,2	1,1	1,2	1,9
	Essai	1,4	1,5	1,5	1,7
5	Témoin	1,3	1,5	1,2	2,8
	Essai	1,5	1,4	1,4	3,4
6	Témoin	0,8	0,9	1,1	1,5
	Essai	1,5	1,6	1,5	2,8
7	Témoin	1,1	1,2	1,1	1,8
	Essai	1,3	1,6	1,6	1,9
8	Témoin	1,2	1,2	1,1	1,7
	Essai	1,4	1,4	1,6	3,1
9	Témoin	1,3	1,2	1,3	1,9
	Essai	1,5	1,5	1,6	2,8
10	Témoin	1,1	1,3	1,6	2,1
	Essai	1,4	1,5	1,8	2,3

Tableau (suite)

		Nombre de ml. de soude N/10 versés			
		à 0 h.	6 h. après	8 h. après	24 h. après
11	Témoin	1,3	1,3	1,4	2
	Essai	1,2	1,4	1,4	2,3
12	Témoin	1,1	1,1	1,5	1,8
	Essai	1,5	1,5	1,8	2,6
13	Témoin	1	1,2	1,1	1,7
	Essai	1,3	1,2	1,4	1,9
14	Témoin	1,3	1,3	1,3	2,1
	Essai	1,5	1,4	1,7	3,1
15	Témoin	0,8	0,9	1,3	1,9
	Essai	1,6	1,8	2,3	5,5
16	Témoin	1,5	1,5	1,7	1,9
	Essai	1,1	1,3	1,4	2,5
17	Témoin	1,4	1,5	1,8	2
	Essai	1,3	1,3	1,7	1,9
18	Témoin	1,2	1,2	1,4	1,7
	Essai	1,3	1,8	1,9	3,5
19	Témoin	1,1	1,2	1,3	1,6
	Essai	1,2	1,4	1,5	2,9
20	Témoin	1,3	1,3	1,4	1,5
	Essai	1,3	1,2	1,6	2,2

Interprétation des résultats

Nous avons vu précédemment que si les acidités constatées dans les tubes de lait suspect ne sont pas inférieures de plus de 5 °/° à celles des tubes témoins, on peut affirmer que le lait suspect ne renferme aucun facteur d'inhibition.

Si l'écart est de l'ordre de 10 °/°, soit au début soit à la fin de l'incubation, on peut soupçonner la présence d'une substance retardatrice, mais à faible concentration. Il est difficile en tous cas, d'affirmer que l'on se trouve en présence d'un antiseptique ajouté frauduleusement. Ce n'est que si les écarts, surtout dans les premières heures, sont très importants, de l'ordre de 20 °/° ou plus par exemple que l'on peut envisager de poursuivre l'examen avec les souches résistantes.

Dans le cas présent aucun des laits examinés ne présente de retard d'acidification par rapport au témoin. On note même dans certains cas que le lait suspect s'acidifie plus vite que le témoin. Ce phénomène est dû au fait que le lait normal renferme déjà des ferments naturels et qu'il peut être mieux pourvu en facteurs de croissance que le témoin stérilisé.

Cette épreuve nous permet d'affirmer l'absence dans les laits incriminés de facteurs d'inhibition de la fermentation lactique. Il est inutile dans ce cas de poursuivre plus loin l'expérimentation.

L'ensemble des recherches entreprises sur les laits pasteurisés conditionnés de la région provençale (*) par la méthode chimique et par la méthode biologique nous autorise à conclure à l'absence de tout antiseptique dans les échantillons de lait examinés.

(*) — Chaque semaine et pendant 1 mois nous avons effectué des recherches sur un échantillon de lait provenant de 5 ateliers différents.

Essais toxicologiques sur l'animal

Nous avons vu que les travaux américains sur la toxicité chronique des sels d'ammoniums quaternaires, ceux de FITZHUGH et NELSON (22) en particulier, présentaient de nombreuses lacunes.

Ces auteurs s'intéressent surtout aux troubles de la croissance et aux manifestations cliniques.

Notre travail a pour but d'apporter, dans la mesure de nos moyens, quelques éclaircissements sur les modifications que peuvent entraîner ces nouveaux antiseptiques dans la formule sanguine et sur la flore intestinale chez l'animal.

Nous nous sommes attaché au problème suivant : étant donné que les sels d'ammoniums quaternaires trouvent une utilisation de plus en plus grande dans l'industrie laitière, d'une part pour le nettoyage des bidons, que ces bidons peuvent être rincés d'une façon insuffisante ou ne pas l'être du tout, d'autre part pour le nettoyage des circuits de pasteurisation, ou encore introduits frauduleusement dans un but de conservation, on peut être amené à trouver dans le commerce des laits contenant une certaine dose d'antiseptique.

Si le procédé est courant, cette fraude peut se répéter chaque jour. Dans ce cas, un lait fraudé aux ammoniums quaternaires peut présenter pour un nourrisson dont il constitue la nourriture exclusive une source d'intoxication permanente. Il paraît utile d'en déceler les symptômes et d'en suivre l'évolution.

Détermination de la dose journalière à faire ingérer aux animaux :

Il était difficile à priori de la déterminer sinon empiriquement. En raisonnant d'une manière peut être fausse mais dans un esprit de logique, nous avons essayé de transposer de l'enfant à l'animal, ce qui est certes critiquable. La dose inhibitrice des sels d'ammoniums quaternaires vis-à-vis des bactéries lactiques est voisine de 0,1 gr. par litre. En supposant qu'un nourrisson absorbe 1 litre de lait par jour, nous nous sommes proposé de soumettre les animaux en expérience à un régime semblable, en observant les rapports de poids.

Protocole expérimental.

Nous avons choisi comme animaux le lapin et le cobaye. Si nous fixons à 100 mg la dose d'antiseptique pouvant être ingérée

journellement avec 1 litre de lait par un nourrisson de 5 kg, la dose correspondante pour les animaux est respectivement de :

— 80 ml de lait pour un cobaye de 400 gr.
— 400 ml de lait pour un lapin de 2 kg.

De telles quantités de liquide sont difficiles à faire absorber aux animaux. Pour la commodité de l'expérience nous avons réduit les volumes à :

— 4 ml de lait à 2/1.000 d'ammonium quaternaire pour un cobaye de 400 gr.
— 20 ml de lait à 2/1.000 d'ammonium quaternaire pour un lapin de 2 kg.

Nous avons utilisé le « Désogène » que nous avons fait ingérer tous les jours pendant 4 mois en solution dans du lait, à un lot de 4 lapins et de 3 cobayes.

Cette mixture était administrée au moyen d'un biberon. Les animaux recevaient par ailleurs une nourriture normale de son, de grains, et d'herbe.

Pendant ces 4 mois nous avons procédé, toutes les semaines, à des examens hématologiques et nous avons suivi l'évolution de la flore intestinale.

Les doses administrées se révélèrent trop faibles et furent pratiquement sans effet sur les animaux. Nous avons jugé inutile de rapporter ici le détail de ce travail préliminaire.

Une seconde expérience fut donc entreprise dans les mêmes conditions avec d'autres animaux et des doses plus fortes de « Désogène ». Elle porta sur *6 mois* et fut réalisée sur un lot de cobayes femelles pesant respectivement :

— cobaye I : 620 gr.
— cobaye II : 375 gr.
— cobaye III : 545 gr.

et sur une lapine de 2,250 kg.

Les animaux en expérience reçurent chaque jour, per os, 50 mg de « Désogène » par kg de poids en solution dans du lait alors que la dose utilisée antérieurement était de 20 mg.

Il fut procédé comme précédemment, les animaux s'adaptant facilement à ce régime.

Toutes les semaines jusqu'à la 5me, puis tous les 15 jours les animaux furent soumis à différents examens, à savoir :

1°/ — Examen hématologique comprenant :
— une numération globulaire
— une formule leucocytaire.

2°/ — Examen bactériologique des selles comprenant :
a/ — l'étude de frottis de selles fraîches colorés par la méthode de Gram et au Lugol,
b/ — la numération approximative des germes vivants en milieu aérobie.

En fin d'expérience les animaux survivants furent sacrifiés et autopsiés.

La lapine ne survécut pas à plus de 7 semaines de traitement. Le cobaye III mourut au bout de 15 semaines.

Les deux autres cobayes survécurent.

Dans l'ensemble les animaux présentèrent un comportement normal sans perte d'appétit. Nous avons observé cependant dès la 4me semaine une différence marquée dans l'aspect des selles, qui, sans être diarrhéïque, prirent une consistance molle ou pâteuse.

Etude de la croissance.

Le poids de la lapine resta stationnaire pendant sept semaines aux environs de 2 kg.

Les cobayes I et II parurent poursuivre une croissance normale avec des augmentations respectives de 40 et 170 gr.

Le cobaye III par contre, subit en l'espace de 15 semaines une perte de poids de 125 gr.

Poids	avant	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois
Cobaye I	620	590	545	560	575	600	660
Cobaye II	375	380	390	480	455	490	545
Cobaye III	545	540	530	535	410	MORT	

On note chez le cobaye I une diminution du poids dans les 2 premiers mois puis une nette reprise par la suite.

EXAMEMS HÉMATOLOGIQUES

Les résultats sont consignés dans les tableaux I et II qui suscitent les remarques suivantes :

1°/ — Les variations quantitatives des hématies et des leucocytes au cours de l'expérimentation paraissent peu influencées par l'administration de « Désogène ». Nous pouvons noter cependant une légère diminution du nombre des globules rouges pendant les premières semaines avec stabilisation par la suite.

2°/ — En ce qui concerne la formule sanguine nous pouvons noter en général à partir de la 3me semaine une augmentation très nette du pourcentage des polynucléaires éosinophiles, ce pourcentage subissant d'ailleurs des variations au cours des examens successifs.

TABLEAU I

Numérations globulaires

LAPIN

1er mois — 2e mois

	Avant	1re Sem.	2e Sem.	3e Sem.	4e Sem.	5e Sem.	7e Sem.	MORT
G. R.	4.800.000	4.400.000	4.600.000	4.300.000	4.400.000	4.500.000	4.300.000	
G. B.	4.500	4.000	3.800	5.800	5.900	5.800	5.900	

COBAYE No I

1er mois — 2e mois

	Avant	1re Sem.	2e Sem.	3e Sem.	4e Sem.	5e Sem.	7e Sem.	9e Sem.
G. R.	4.600.000	4.400.000	4.200.000	3.900.000	4.300.000	4.500.000	4.600.000	4.500.000
G. B.	8.000	5.900	6.400	5.900	5.500	6.900	5.800	4.8

ᵉ mois		4ᵉ mois		5ᵉ mois		6ᵉ mois	
Sem.	13ᵉ Sem.	15ᵉ Sem.	17ᵉ Sem.	19ᵉ Sem.	21ᵉ Sem.	23ᵉ Sem.	SACRIFIE
.000	4.400.000	4.200.000	4.300.000	4.100.000	4.200.000	4.000.000	
.000	4.700	6.000	5.500	6.100	5.900	6.900	

TABLEAU I (Suite)

COBAYE No II

1er mois — 2e mois

	Avant	1re Sem.	2e Sem.	3e Sem.	4e Sem.	5e Sem.	7e Sem.	9e Sem
G. R.	4.800.000	4.600.000	4.300.000	4.100.000	3.900.000	4.100.000	4.300.000	4.200.0
G. B.	5.700	5.800	5.100	4.800	5.800	5.700	6.200	5.4

COBAYE No III

1er mois — 2e mois

	Avant	1re Sem.	2e Sem.	3e Sem.	4e Sem.	5e Sem.	7e Sem.	9e Sem
G. R.	4.700.000	4.200.000	3.900.000	3.700.000	4.000.000	4.100.000	4.200.000	4.200.0
G. B.	5.800	4.600	4.100	4.000	4.000	3.800	4.500	7.9

3e mois		4e mois		5e mois		6e mois	
Sem.	13e Sem.	15e Sem.	17e Sem.	19e Sem.	21e Sem.	23e Sem.	
0.000	4.200.000	4.500.000	4.200.000	4.300.000	4.100.000	4.300.000	SACRIFIE
5.800	7.400	6.500	7.200	6.200	7.000	6.400	

3e mois		4e mois	
Sem.	13e Sem.	15e Sem.	
0.000	4.100.000	4.000.000	MORT
7.800	6.800	7.000	

TABLEAU II

Formules leucocytaires

LAPIN

	Avant	1re Sem.	2e Sem.	3e Sem.	4e Sem.	5e Sem.	7e Sem.	MORT
Poly neutro	15	14	21	32	29	19	21	
Poly éosino	2	1	1	6	10	6	8	
Poly baso	2	1	5	1	1	4	2	
Lymphocytes	77	81	72	58	54	65	65	
Monocytes	4	3	1	3	6	6	4	

COBAYE I

	Avant	1re Sem.	2e Sem.	3e Sem.	4e Sem.	5e Sem.	7e Sem.	9e S
Poly neutro	32	27	30	38	39	35	44	3
Poly éosino	1	3	3	7	4	3	6	
Poly baso	0	0	1	0	0	0	0	
Lymphocytes	61	68	63	52	54	61	49	5
Monocytes	6	2	3	3	3	1	1	

Sem.	13e Sem.	15e Sem.	17e Sem.	19e Sem.	21e Sem.	23e Sem.	SACRIFIE
24	33	28	36	24	29	19	
3	2	4	11	9	8	10	
1	0	0	1	2	0	1	
70	63	67	50	65	62	68	
2	2	1	2	0	1	2	

TABLEAU II (Suite)

COBAYE II

	Avant	1re Sem.	2e Sem.	3e Sem.	4e Sem.	5e Sem.	7e Sem.	9e Sem
Poly neutro	43	26	34	33	34	27	41	32
Poly éosino	1	2	4	7	7	7	7	6
Poly baso	0	1	0	0	0	0	1	0
Lymphocytes	52	69	61	59	58	63	48	60
Monocytes	4	2	1	1	1	3	3	2

COBAYE III

	Avant	1re Sem.	2e Sem.	3e Sem.	4e Sem.	5e Sem.	7e Sem.	9e Sem
Poly neutro	26	30	26	30	33	32	32	19
Poly éosino	3	3	16	13	14	13	9	4
Poly baso	0	2	0	0	0	0	0	0
Lymphocytes	69	65	54	56	52	55	57	73
Monocytes	2	0	4	1	1	0	2	4

Sem.	13e Sem.	15e Sem.	17e Sem.	19e Sem.	21e Sem.	23e Sem.	SACRIFIE
2	29	26	30	27	26	30	
9	4	9	8	9	7	8	
0	0	0	0	1	0	1	
7	65	65	60	62	64	59	
2	2	0	2	1	3	2	

Sem.	13e Sem.	15e Sem.	MORT
1	17	22	
4	7	9	
1	0	1	
2	75	68	
2	1	0	

EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE DES SELLES

Notre étude des modifications de la flore intestinale des animaux en expérience sous l'action du « Désogène » comporte une suite d'examens entrepris à espaces réguliers et dans les mêmes conditions, avant le début de l'expérience, tous les huit jours pendant 2 mois, tous les quinze jours ensuite.

Ces examens comprennent :

1/ — *des numérations de germes aérobies* en gélose ordinaire en boîte de Pétri

2/ — *l'observation directe de l'évolution de la flore sur frottis de selles fraîches colorés au Gram et au Lugol.*

Conditions opératoires.

Les crottes fraîches des animaux furent recueillies peu après leur émission sur une feuille de papier filtre étalée sous le grillage du plancher de la cage ou sur des plateaux émaillés.

La numération des germes porte sur un gramme de crottes fraîches. Il faut procéder à des dilutions successives de cette prise d'essai jusqu'à l'obtention d'une suspension contenant un nombre de germes convenable pour donner des colonies comptables.

1°/ — *Numération des germes aérobies.*

Nous avons effectué l'ensemencement sur gélose ordinaire en boîtes de Pétri. Divers tâtonnements nous ont permis de fixer le taux de la dilution à 1/10.000.000e.

Mode opératoire.

On introduit 1 gramme de crottes dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile; on mélange soigneusement avec un agitateur stérile de manière à obtenir une suspension bien homogène; on procède ensuite aux dilutions successives.

1 ml de la dernière dilution (au 1/10.000.000e) est introduit dans une boîte de Pétri stérile. On coule 20 cm^3 environ de gélose ordinaire et on place à l'étuve à 37° pendant 48 h. On procède alors à la numération des colonies qui se sont développées.

Pour obtenir une meilleure approximation nous avons effectué chaque examen en double. Les chiffres qui figurent dans le tableau représentent donc la moyenne de deux lectures pour chaque échantillon de matière fécale et pour chaque animal.

1°/ — *Examens avant administration de « Désogène ».*

Notons que la flore aérobie du lapin présente en gros les mêmes caractères que celle des cobayes.
A l'examen on distingue deux grandes catégories de colonies :

a/ — *les colonies microbiennes,* où, parmi celles des germes variés de la flore saprophyte, on peut repérer les colonies de bacilles lactiques caractérisées par leur aspect translucide.

b/ — *les colonies de levures* jaunes ou grisâtres, opaques, à bords généralement crénelés, prenant en vieillissant des formes boursouflées ou cratériformes.

Nous avons confirmé ce repérage macroscopique par des examens microscopiques de frottis des diverses colonies.

Les colonies microbiennes prédominent très nettement. Nous avons pu dénombrer chez le lapin avant le début de l'expérience près de 600 millions de germes pour seulement 6 millions de levures environ.

Chez les cobayes les bactéries atteignent le milliard, les levures approximativement 80 millions.

2°/ — *Evolution de la flore intestinale au cours de l'expérience.*

La suite des examens nous a montré que la numération de la flore intestinale ne pouvait avoir un caractère rigoureux. Nous avons en effet observé d'assez grandes variations d'une semaine à l'autre, ce qu'il était logique de prévoir. Nous avons donc pensé qu'il ne fallait tenir compte que des variations très importantes qui pourraient avoir une signification en rapport avec le traitement administré.

La numération aussi soigneuse que possible des colonies microbiennes nous a servi à apprécier un ordre de grandeur, mais nous avons préféré dans ce travail traduire les variations quantitatives de la flore par une notation en +.

En ce qui concerne les colonies microbiennes :

\+ = moins de 500 millions de germes
\++ = de 500 millions à 1 milliard de germes
\+++ = de 1 à 2 milliards de germes
\++++ = plus de 2 milliards de germes.

En ce qui concerne les colonies de levures :

\+ = moins de 50 millions de germes
\++ = de 50 à 100 millions de germes
\+++ = de 100 à 500 millions de germes
\++++ = plus de 500 millions de germes.

Les résultats sont exprimés dans les tableaux suivants :

Numération des germes vivants totaux par gramme de matières fécales chez les animaux en expérience

COBAYES *(MOYENNE SUR 3 ANIMAUX)*

	Avant	1re S.	2e S.	3e S.	4e S.	5e S.	7e S.	9e S.	11e S.	13e S.	15e S.	17e S.	19e S.	21e S.	23e S.	
colonies microbiennes	+++	+++	++++	++++	+	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++	SACRIFIE
colonies de levures	++	+	++	++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	++++	++	+++	++++	++++	

LAPIN

	Avant	1re S.	2e S.	3e S.	4e S.	5e S.	7e S.	
colonies microbiennes	++	+++	+	+	+	+	+	MORT
colonies de levures	+	+	+	+	+++	+++	+++	

Il ressort de notre expérimentation détaillée, résumée et synthétisée en quelque sorte dans les tableaux ci-dessus :

1°/ — que la flore microbienne fécale des animaux en expérience (cobayes et lapin) subit dans le temps des variations assez importantes, ce qu'il était logique de prévoir malgré les précautions prises pour observer une régularité du régime alimentaire pendant toute la durée du traitement.

2°/ — Fait intéressant et remarquable par sa netteté et la fixité dans la date de son apparition, on assiste à la 4me semaine pour les deux espèces animales à une chute brutale et importante du nombre des bactéries. Pour les cobayes, par exemple, alors que les germes vivants totaux se chiffrent aux environs de 2 milliards par gramme à la 3me semaine, leur nombre chute à quelques millions seulement à la 4me semaine.

3°/ — Par la suite, soit vers la 7me semaine, malgré des variations signalées plus haut, le nombre de germes vivants s'élève à nouveau sans jamais atteindre cependant les chiffres des trois premières semaines, très vraisemblablement par sélection de souches résistantes.

Les examens directs de frottis de selles fraîches montreront d'ailleurs, comme nous le verrons plus loin, une diminution sensible de la flore bleue et une augmentation de la flore rouge résistante.

4°/ — Une dernière remarque, de très grande importance et qui vient confirmer sur le plan expérimental les faits observés en pathologie humaine, on note au moment de l'effondrement du nombre des bactéries une augmentation considérable et significative du nombre des champignons levuriformes.

Enfin, dans une expérimentation dont nous ne rapporterons pas ici les détails, nous avons envisagé l'étude de l'évolution quantitative de la flore anaérobie par culture et numération en gélose VF.

Il ressort des examens effectués en série parallèlement à l'étude de la flore aérobie que le « Désogène » n'influence pratiquement pas le nombre de germes anaérobies présents dans la flore fécale.

EXAMEN DES FROTTIS DE SELLES FRAICHES APRÈS COLORATION AU GRAM ET AU LUGOL

Les frottis de selles fraîches effectués chaque semaine ont été colorés au fur et à mesure par la méthode de Gram (2 frottis) et par le Lugol (2 frottis).

Pour tenter d'avoir une vue d'ensemble plus précise nous avons pratiqué l'examen microscopique de ces préparations en série en fin d'expérience, de manière à pouvoir établir des comparaisons et émettre des appréciations valables que nous consignons dans le tableau ci-après :

LAPIN

Coloration au Gram	*Coloration au Lugol*
Avant : légère prédominance de la flore rouge, quelques très rares levures.	*Avant :* flore iodophile pratiquement inexistante.
1re Sem. : prédominance de la flore rouge, quelques levures.	*1re Sem. :* très rare flore iodophile.
2e Sem. : — » —	*2e Sem. :* — » —
3e Sem. : — » —	*3e Sem. :* — » —
4e Sem. : nette prédominance de la flore rouge, très nombreuses levures.	*4e Sem. :* flore iodophile nettement plus abondante.
5e Sem. : flore rouge presque exclusive. très nombreuses levures.	*5e Sem. :* flore iodophile très abondante.
7e Sem. : — » —	*7e Sem. :* — » —

MORT

COBAYES

Coloration au Gram		*Coloration au Lugol*	
Avant :	flores bleues et rouges à peu près équivalentes, quelques levures.	*Avant :*	flore iodophile pratiquement inexistante.
1re Sem. :	légère prédominance de la flore rouge, quelques levures.	*1re Sem. :*	— » —
2e Sem. :	— » —	*2e Sem. :*	— » —
3e Sem. :	— » —	*3e Sem. :*	— » —
4e Sem. :	flore rouge nettement prédominante, nombreuses levures.	*4e Sem. :*	— » —
5e Sem. :	— » —	*5e Sem. :*	flore iodophile en augmentation nette.
7e Sem. :	nombre des levures en forte augmentation, flore rouge très nettement prédominante et quantitativement accrue.	*7e Sem. :*	flore iodophile importante.
9e Sem. :	— » —	*9e Sem. :*	— » —
11e Sem. :	— » —	*11e Sem. :*	— » —
13e Sem. :	— » —	*13e Sem. :*	nette augmentation de la flore iodophile.
15e Sem. :	— » — nombreuses levures.	*15e Sem. :*	stabilisation.
17e Sem. :	— » —	*17e Sem. :*	— » —
19e Sem. :	nombre des levures en augmentation très sensible par rapport à la semaine précédente.	*19e Sem. :*	— » —
21e Sem. :	— » —	*21e Sem. :*	— » —
23e Sem. :	— » —	*23e Sem. :*	— » —

Nous pouvons donc noter les faits suivants :

1°/ — le sel d'ammonium quaternaire utilisé dans nos expériences agit rapidement sur la flore bleue en l'inhibant dès la 1re semaine.

2°/ — Il possède une action sur la flore rouge qui se manifeste par une diminution numérique transitoire maxima aux 4me et 5me semaines. Par la suite vers la 7me semaine le nombre de germes s'accroît sensiblement, ce qui vient confirmer les numérations de germes vivants effectuées par ailleurs.

3°/ — Confirmant encore nos précédents examens, le nombre des champignons levuriformes s'accroît considérablement dès la 4me semaine et nous avons pu noter sur le frottis de la 19me semaine un chiffre particulièrement élevé.

4°/ — La flore iodophile, presque inexistante avant l'expérience et en très faible quantité les premières semaines, s'accroît progressivement et devient importante dès la 5me semaine.

Ainsi :

— diminution de la flore bleue
— augmentation relative de la flore rouge
— augmentation considérable du nombre des champignons levuriformes
— augmentation de la flore iodophile

vont de pair et sont les faits marquants que l'on peut observer dans l'évolution de la flore fécale des animaux en expérience sous l'influence de l'administration de doses régulières de « Désogène ».

AUTOPSIE DES ANIMAUX

LAPIN.

La mort du lapin est survenue accidentellement au bout de la 7me semaine.

On observe un amaigrissement de 200 gr. et des selles de consistance plus molle sinon diarrhéiques dès la 5me semaine.

Autopsie : On note seulement un état congestif des poumons, et essentiellement une augmentation de volume du colon.

COBAYE III.

Mort au bout de 15 semaines de régime. Amaigrissement de 50 gr. Selles diarrhéiques.

Autopsie : Estomac dilaté rempli de liquide
Colon légèrement distendu
Foie, rate, poumons, cœur, reins et surrénales macroscopiquement sains.

Les cobayes I et II ayant survécu à la 23me semaine d'expérience furent sacrifiés.

COBAYE I.

Autopsie : Pas d'exsudat péritonéal, pas d'hémorragie
Colon dilaté
Foie, rate, poumons, cœur, reins, surrénales normaux.

COBAYE II.

Autopsie : Pas d'exsudat péritonéal, pas d'hémorragie
Colon distendu
Foie, rate, poumons, cœur, reins, surrénales normaux.

En conclusion, tous les animaux présentent la même distension intestinale Ce fait avait déjà été mentionné par FITZHUGH et NELSON (22). Cependant nous n'avons pas observé comme ces auteurs d'exsudat péritonéal.

Ces modifications du volume intestinal ne sont pas pour nous surprendre et nous pensons qu'on peut les rattacher simplement aux variations importantes de la flore mirobienne.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

A la suite des travaux de nombreux auteurs — parmi lesquels il faut citer ceux tout récents de TRUHAUT — nous avons été justement préoccupé par la présence possible accidentelle ou frauduleuse de substances antiseptiques dans les denrées alimentaires de consommation courante.

Intéressé au Laboratoire de Microbiologie du Professeur GREBUS par le problème laitier, nous avons trouvé légitime d'envisager, comme point de départ de notre travail, l'étude d'un groupe d'antiseptiques fréquemment utilisés dans cette industrie pour le nettoyage du matériel : les sels d'ammoniums quaternaires.

Une de ces substances a été l'objet de notre étude, il s'agit du méthosulfate de méthyl-phényl-dodecyl-triméthyl-ammonium (« Désogène »).

Après avoir rappelé les notions classiques concernant les sels d'ammoniums quaternaires, nous avons essayé de faire une synthèse de nos connaissances sur leur structure chimique et leur activité antiseptique, particulièrement bactéricide, fongicide, fongostatique et sporicide, puis nous avons tâché d'exposer ce que l'on peut savoir de leur toxicité, et indiqué les méthodes chimiques et biologiques permettant leur détection dans les denrées alimentaires.

La première étape de notre travail personnel a eu pour but de rechercher dans un certain nombre d'échantillons de laits pasteurisés de la région, les sels d'ammoniums quaternaires, par les méthodes chimiques et la méthode biologique de PIEN et Coll.

Aucune de ces techniques ne nous a permis de découvrir la présence de ces antiseptiques.

Dans une seconde partie nous avons étudié après quelques tâtonnements en matière de posologie, l'influence, chez l'animal, de l'administration orale, prolongée, d'un sel d'ammonium quaternaire (« Désogène »).

a/ — sur la cytologie sanguine;

b/ — sur la flore intestinale du cobaye et du lapin.

En ce qui concerne la cytologie sanguine dont l'étude a été poursuivie régulièrement chez le lapin pendant 7 semaines et pendant 6 mois chez 2 cobayes sur 3, avec des prélèvements hebdomadaires jusqu'à la 5me semaine, puis tous les 15 jours ensuite, on n'a pu observer dans la lignée rouge qu'une baisse sensible des hématies pendant les deux premières semaines avec stabilisation ultérieure.

Les variations constatées sont minimes et étant donné le pourcentage d'erreurs inhérentes à la méthode de numération, nous pensons qu'il n'est pas logique d'y voir une relation de cause à effet.

Les formules leucocytaires montrent par contre une éosinophilie marquée dès la 2me ou 3me semaine du traitement, éosinophilie qui malgré des variations se maintient à un taux toujours nettement supérieur à celui que l'on pouvait constater avant le traitement.

L'étude des modifications de la flore intestinale du lapin et du cobaye sous l'influence de l'administration de « Désogène » nous a apporté des résultats intéressants auxquels nous pouvions d'ailleurs nous attendre en nous référant aux travaux effectués sur les antibiotiques utilisés en thérapeutique. Trois faits marquants d'une grande netteté et surtout d'une fixité constante dans le temps doivent retenir notre attention :

1°/ — La flore microbienne intestinale des animaux en expérience est profondément perturbée aux environs de la 4me semaine — soit au point de vue quantitatif : le nombre des germes vivants étant réduit de façon très sérieuse — soit au point de vue qualitatif : la flore bleue étant nettement diminuée.

2°/ — Alors que les bactéries tendent à disparaître à partir de la 4me semaine, le nombre de levures augmente considérablement et se maintient sensiblement pendant toute la durée de l'expérimentation.

3°/ — La flore iodophile presque inexistante avant le traitement s'accroît dans de fortes proportions.

Nous pouvons constater accessoirement que la flore rouge, après une nette diminution les premières semaines, s'accroît par la suite sans doute par sélection de races résistantes.

La distension colique constatée à l'autopsie des animaux paraît en relation avec la perturbation marquée de la flore intestinale. D'autre part, depuis que divers auteurs l'ont signalé (MOUSTARDIER (45), nous ne devons pas ignorer le rôle des bactéries dans la vitamino-synthèse et il semble que la destruction ou le bouleversement de cette flore amène des avitaminoses à retentissements plus ou moins lointains.

Ainsi l'absorption répétée et de longue durée de substances antiseptiques telles que les sels d'ammoniums quaternaires se traduit par un trouble profond dans l'équilibre de la flore intestinale.

Non seulement la rupture de cet équilibre peut occasionner des désordres locaux d'ordre digestif par destruction enzymatique par exemple, ou des troubles généraux par défaut de synthèse vitaminique, mais on assiste aussi à l'invasion du tube digestif par des champignons levuriformes.

Ces derniers sont extrêmement résistants et trouvent par élimination de la concurrence vitale un terrain favorable à leur développement explosif, puisque les sels d'amonniums quaternaires sont peu fongicides.

Nous savons l'importance de ces troubles observés en pathologie humaine à la suite de traitements par les antibiotiques qui, en se prolongeant, peuvent provoquer des mycoses plus ou moins généralisées, et toujours graves, contre lesquelles nous sommes peu armés, sauf dans le cas de Candida albicans (Berk), heureusement sensible à la Mycostatine.

Il est donc nécessaire à notre avis d'être extrêmement prudents en ce qui concerne l'emploi des sels d'ammoniums quaternaires utilisés comme antiseptiques dans la désinfection du matériel destiné à recevoir des denrées alimentaires de consommation courante.

On ne peut que féliciter le législateur des soins qu'il apporte à codifier et à restreindre l'emploi des substances antiseptiques ou insecticides. En effet, leur présence permanente accidentelle ou frauduleuse dans l'alimentation peut amener des troubles très graves pour l'équilibre sanitaire de la population.

Vu et approuvé :
Pour le Doyen, l'Assesseur :
DELPHAUT

Vu,
Le Président du Jury :
PELLISSIER

Vu et permis d'imprimer :
Aix, le 6 Juin 1956
Le Recteur : BLACHE

BIBLIOGRAPHIE

La dernière thèse sur un sujet voisin étant celle de Mad. KOEBE-AMIN, nous ne rapporterons ici que les références particulièrement adaptées à notre sujet.

1. ADELSON (L.), SUNSHINE (I.). — *Am. Journ. Clinic. Pathol.*, 1952, **22**, 656-61.
2. ALFREDSON (B. V.), STIFFEL (J. R.), THORP (F.), BATEN (W.D.), GRAY (M.L.). — *Journ. Amer. Pharm. Assoc.*, 1951, **40**, 263-267.
3. AUERBACH (M. E.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1943, **15**, 492.
4. AUERBACH (M. E.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1944, **16**, 739.
5. BADINAND - GUIRAUD. — *Lyon pharmaceutique*, 1954, **5** 135.
6. BALATRE (P.). — *Bulletin de la Société de Pharmacie de Lille*, 1955, **2**, 111.
7. BECHER (T. J.), WARREN (M.R.), MARSH (D.G.), SHELTON (R.S.). — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1942, **74**, 401.
8. BENIGNO (B.), BERTI (T.). — *Att. Accad. Nazion. Lincei. Rendic. Cl. Sc. mat. nat.*, 1951, **10**, 57-63.
9. BUTTERFIELD (C.T.), WATTIE (E.), CHAMBERS (C.W.). — *Publ. Hlth. Rep. U.S.A.*, 1950, **65**, 1039-1056.
10. CHAIGNEAU (M.). — *Produits pharmaceutiques*, 1955, **5**. 304-306.
11. COLICHMAN (E.L.). — *Ind. Eng. Chem. Anal.*, 1947, **19**, 430 et *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 1834.
12. COLLINS (E.B.), JOHANSSEN (K.R.). — *J. Dairy Sc. U.S.A.*, 1951, **34**, 303-309.
13. CRUICKSCHANK - SQUIRE (J.R.). — *Brit. J. Industr. Med.*, 1949, **6**.
14. DALLEMAGNE (M.-J.). — *Actual. Pharmacol.*, 4me série (Masson & Cie), 1951, p. 1.
15. DAMIENS (R.). — *Ann. Chim. Fr.*, 1951, **6**,, 635-79.
16. DOMAGK (G.). — *Deut. Med. Wolchschr.*, 1935, **61**, 829.
17. DUBOIS (A.S.), DIBBLEE (D.D.). — *J. Milk. Tech.*, 1946, **9**, 260.

18. DUMAS (J.). — Les animaux de laboratoire. *Collection de l'Institut Pasteur*, p. 19-36.
19. DUNN (C.G.). — *Proc. Exptl. biol. Med.*, 1938, **37**, 661.
20. EGGENBERGER (D.N.), HARRIMANN (L.A.), MAC CLORY (M.J.), NOEL (D.), HARWOOD (H.J.). — *Ann. New-York. Acad. Sc.*, 1950, 53, **1**, 105-11.
21. FINNEGAN (J.K.), LARSON (P.S.), SMITH (R.B.), HAAG (H.B.), REID (L.D.), DREYFUSS (M.L.). — *Journ. Pharmaco. Exp. Therap.*, 1953, 109, 422-430.
22. FITZHUGH (O.G.), NELSON (A.A.). — *J. Am. Pharm. Assoc. Sc. Ed.*, 1948, **37**, 29.
23. FLOTOW (E.). — *Pharm. Zentralhalle.*, 1942, **83**, 181.
24. GERSHENFELD (L.), STEDMANN (R.L.). — *Am. J. Pharm.*, 1949, **12**, 249-67.
25. GOTTLIEB (K.R.). — *Dansk Tidss Farm.*, 1953, **27**, 198.
26. GRASSET. — *Bull. Fédér. Soc. Gynécol. Obstr.*, 1954, **6**, 181.
27. GROSSI (C.). — *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1951, **31**, n° **1**.
28. GURRANN (H.R.), EVANS (F.R.). — *J. Dairy Sc. U.S.A.*, 1950, **33**, n° 1.
29. HARTLEY (G.S.), RUNNICLES (D.F.). — *Proc. Roy. Soc. London.*, 1938, **168**, 420.
30. JACOBS (W.A.), HEIDELBERGER (M.). — *J. Biol. Chem.*, 1915, **20**, 659 et 685. — *J. Biol. Chem.*, 1915, **21**, 103, 145, 403, 439, 455, 465.
31. KEITH (S.F.), GREEN (H.D.), WILLIAMS (S.C.), DAVIS (C.C.). — *Circul. U.S.A.*, 1952, **6**, 902-10.
32. KLARMANN (E.G.), WRIGHT (E.S.). — *Soap. Sanit. Chem.*, 1946, **22**, 125. — *Id.* 1946, **22**, 139.
33. KLARMANN (E.G.), WRIGHT (E.S.). — *Am. Journ. Pharm.*, 1948, **120**, 146.
34. KLARMANN (E.G.), WRIGHT (E.S.). — *Am. Journ. Pharm.*, 1950, **122**, 330-336.
35. KLARMANN (E.G.), WRIGHT (E.S.). — *Am. Journ. Pharm.*, 1954. **126** n° 8.
36. KOEBE-AMIN (L.). — Th. Doct. (Univ.) Pharm., Marseille, Février 1955.
37. KOSIKOWSKY (F.V.). — *J. Dairy Sc.*, 1942, **25**, 169.
38. LAGRANGE, THOMAS (J.), SIMON (C.), PETIT (M.). — *J. Pharm. Belge*, 1952, **7**, 217.
39. LAMBIN (S.). — Th. Doct. Sc., Paris, 1933.
40. LAWRENCE (C.A.). — *Acad. Press. N.Y.*, 1950.
41. LECHAT (P.). — *Thérapie 1954*, Tome IX, n° 6.
42. MAC CULLOCH (E.C.). — *J. Bact.*, 1947, **53**, 370.
43. MASON (C.T.), BROWN (R.W.), MINGA (A.E.). — *Phytopathologie U.S.A.*, 1951, **41**, 164-171.

44. MILLER (D.D.), ELLIKER (P.R.). — *J. Dairy Sc.*, 1951, **34**, 273 et 279.
45. MOUSTARDIER, BENTEGEAT, LE NOC (P.). — Sté Franç. de Microb. in *Ann. Inst. Past.*, 1956, **90**, nº 4, 489-498.
46. MULLS (L.E.), FOOTS (E.L.). — *J. Milk and Food Tech.*, 1947, **10**, 102.
47. PELLISSIER (F.), BERNARD (P.), KOEBE (L.), RUSSO (A.). — *Bull. Soc. Ph., Marseille*, 1955, **4**, nº 15, 275-284.
48. PIEN (J.), DESIRANT (J.-M.), Mme ROCHELLE. — *Ann. Falsif. et Fraudes*, 1951, p. 290.
49. PIEN (J.), LIGNAC (J.), CLAUDE (P.). — *Ann. Falsif. et Fraudes*, 1953, p. 258.
50. POLONOVSKI (J). — Th. Doct. Sc., Paris, 1950.
51. QUISNO (R.A.), FOTER (M.J.). — *J. Bact.*, 1946, **52**, 111.
52. RENAULT (J.). — *Mises au point Chim. Anal.*, Masson et Cie, 2me série, 1954, p. 56.
53. RENAULT (H.). — *Prod. Pharm.*, 1955, **10**, 683-691.
54. SARTORY (A. et R.), MEYER (J.). — *Microbiologie pratique* (lib. Maloine), Paris, 1950, p. 523.
55. SCHWARTZ (M.). — *Lancet G.B.*, 1949, **256**, nº 6563, 1001-2.
56. SHELTON (R.S.), VAN CAMPEN (M.G.), TILFORD (C.N.), LANG (H.C.), NISONGER (L.L.), BANDELIN (P.J.), RUBENKŒNIG (H.L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 753, 755, 757.
57. SIJPEBTEIJN (A.K.), VAN DER KECK (G.S.M.). — *Antonie van leeuwenhoek Nederl.*, 1952, **18**, 83-106.
58. SMITH (C.R.), NISHIHARA (H.), GOLDEN (F.), HOYT (A.), GUSS (C.O.), KLŒTZEL (M.C.). — *Publ. Hlth. Rep. U.S.A.*, 1950, **65**, 1588-1600.
59. SOIKE (K.F.), MILLER (D.D.), ELLIKER (P.R.). — *J. Dairy Sc. U.S.A.*, 1952, **35**, 764-771.
60. STEWART (J.M.). — *Soap. Sanit. Chem. U.S.A.*, 1950, **26**, 124-127.
61. STUART (L.S.). — *Soap. Sanit. Chemical.*, 1947, **23**, 129.
62. VALKO (E.I.), DUBOIS (A.S.). — *J. Bact.*, 1945, **50**, 481.
63. WILSON (J.B.). — *J. Assoc. off Agr. Chem.*, 1946, **29**, 311.
64. ZISSMANN (E.). — *C. R. Ac. Sc. Fr.*, 1952, **234**, 759-762.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 15

Objet du travail 17
Plan général 18

GENERALITES 19

Généralités sur les antiseptiques 24
Pouvoir antiseptique des sels d'ammoniums quaternaires 26
Toxicité des sels d'ammoniums quaternaires 40
Recherche et dosage des sels d'ammoniums quaternaires antiseptiques 44

RECHERCHES PERSONNELLES

Recherche et dosage des sels d'ammoniums quaternaires dans les laits de la région provençale 54
Essais toxicologiques sur l'animal 59

CONCLUSIONS GENERALES 79

BIBLIOGRAPHIE 83

ACHEVÉ D'IMPRIMER
LE 20 JUIN 1956
SUR LES PRESSES DE LA
MAISON AUBANEL PÈRE
EN AVIGNON

N° 14.0024. - I. 2.317. - Dépôt légal : 2me trimestre 1956. - E. 384.